

DIFFERENTIALDIAGNOSE ZWISCHEN
ABSTOSSUNGSREAKTION, VIRUSINFEKTION UND
CYCLOSPORIN A - TOXIZITÄT
BEI NIERENTRANSPLANTIERTEN PATIENTEN
MITTELS FEINNADELASPIRATIONSZYTLOGIE

BRIGITTE WEBER

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM INSTITUT FÜR CHIRURGISCHE FORSCHUNG
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORSTAND: PROF. DR. W. BRENDL

DIFFERENTIALDIAGNOSE ZWISCHEN ABSTOSSUNGSREAKTION,
VIRUSINFEKTION UND CYCLOSPORIN A - TOXIZITÄT BEI
NIERENTRANSPLANTIERTEN PATIENTEN MITTELS FEINNADEL-
ASPIRATIONSZYTOLOGIE

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Brigitte Weber

aus

München

Jahr

1 9 8 7

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer

Mitberichterstatter : Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Brendel
Prof. Dr. med. G. Heberer

Dekan : Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1987

I. Einleitung	1
II. Aufgaben und Bedeutung	2
III. Aufbau des Buches	3
IV. Die Bedeutung der Familienforschung	4
V. Die Aufgaben der Familienforschung	5
VI. Die Methoden der Familienforschung	6
VII. Die Ergebnisse der Familienforschung	7
VIII. Die Bedeutung der Familienforschung für die Gesellschaft	8
IX. Die Aufgaben der Familienforschung für die Zukunft	9
X. Die Bedeutung der Familienforschung für die Wissenschaft	10
XI. Die Aufgaben der Familienforschung für die Politik	11
XII. Die Bedeutung der Familienforschung für die Kultur	12
XIII. Die Aufgaben der Familienforschung für die Wirtschaft	13
XIV. Die Bedeutung der Familienforschung für die Medizin	14
XV. Die Aufgaben der Familienforschung für die Pädagogik	15
XVI. Die Bedeutung der Familienforschung für die Psychologie	16
XVII. Die Aufgaben der Familienforschung für die Soziologie	17
XVIII. Die Bedeutung der Familienforschung für die Anthropologie	18
XIX. Die Aufgaben der Familienforschung für die Biologie	19
XX. Die Bedeutung der Familienforschung für die Geographie	20
XXI. Die Aufgaben der Familienforschung für die Historie	21
XXII. Die Bedeutung der Familienforschung für die Ethnologie	22
XXIII. Die Aufgaben der Familienforschung für die Linguistik	23
XXIV. Die Bedeutung der Familienforschung für die Philosophie	24
XXV. Die Aufgaben der Familienforschung für die Religion	25
XXVI. Die Bedeutung der Familienforschung für die Kunst	26
XXVII. Die Aufgaben der Familienforschung für die Literatur	27
XXVIII. Die Bedeutung der Familienforschung für die Musik	28
XXIX. Die Aufgaben der Familienforschung für die Theater	29
XXX. Die Bedeutung der Familienforschung für die Film	30
XXXI. Die Aufgaben der Familienforschung für die Fernsehen	31
XXXII. Die Bedeutung der Familienforschung für die Internet	32
XXXIII. Die Aufgaben der Familienforschung für die Mobiltelefone	33
XXXIV. Die Bedeutung der Familienforschung für die Computernetze	34
XXXV. Die Aufgaben der Familienforschung für die Künstliche Intelligenz	35
XXXVI. Die Bedeutung der Familienforschung für die Robotik	36
XXXVII. Die Aufgaben der Familienforschung für die Nanotechnologie	37
XXXVIII. Die Bedeutung der Familienforschung für die Biotechnologie	38
XXXIX. Die Aufgaben der Familienforschung für die Raumfahrt	39
XL. Die Bedeutung der Familienforschung für die Weltraumforschung	40
XLI. Die Aufgaben der Familienforschung für die Klimaforschung	41
XLII. Die Bedeutung der Familienforschung für die Umweltschutz	42
XLIII. Die Aufgaben der Familienforschung für die Energie	43
XLIV. Die Bedeutung der Familienforschung für die Wirtschaft	44
XLV. Die Aufgaben der Familienforschung für die Politik	45
XLVI. Die Bedeutung der Familienforschung für die Kultur	46
XLVII. Die Aufgaben der Familienforschung für die Wissenschaft	47
XLVIII. Die Bedeutung der Familienforschung für die Gesellschaft	48
XLIX. Die Aufgaben der Familienforschung für die Zukunft	49
L. Die Bedeutung der Familienforschung für die Menschheit	50

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	4
I Patientengut	
1. Anzahl, Alters- und Geschlechtsverteilung der transplantierten Patienten	4
2. Art der Transplantation	5
3. Transplantationskriterien	5
4. Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz	6
5. Häufigkeit der Virusinfektionen im Patienten- gut	8
II Klinisches Datengut	9
1. Immunsuppressive Therapie	9
1.1 Basisschema der Azathioprin-Therapie	9
1.2 Basisschema der Cyclosporin A-Therapie	11
1.3 Basistherapie bei Risikopatienten	11
1.4 Therapieschema bei Abstoßungskrisen	13
1.5 Konversionen	13
2. Kriterien der Abstoßungsdiagnostik	14
3. Virusinfektionen	15
3.1 Diagnostik der Virusinfektionen	15
3.2 Therapie der Virusinfektionen	16
III Methode der Feinnadelbiopsie und Aspirations- zytologie	17
1. Bioptische Zellgewinnung aus dem Trans- plantat	17

2.	Zellgewinnung aus dem peripheren Blut	19
3.	Präparation des Zellaspirats und der Blutprobe	19
3.1	Herstellung des Zytozentrifugenpräparats	19
3.2	Färbemethodik nach Pappenheim	20
4.	Befundung des Zellaspirats und der Blutprobe	21
4.1	Lichtmikroskopische Auswertung der Präparate	22
4.2	Differenzierung der Zellen	23
	a) Differenzierung nach myelo-, lymphopoe- tischer Abstammung	23
	b) Differenzierung nach parenchymatöser Herkunft	26
4.3	Errechnung des zellulären Infiltrats im Transplantat	28
4.4	Qualitative Wertung des Infiltrats durch das "Corrected Increment"	30
4.5	Graduierung der zellulären Transplantat- reaktion	31
4.6	Bewertung der Parenchymzellen	32
	a) quantitative Erfassung	32
	b) qualitative Erfassung	34
IV	Methoden zur zytologisch-immunologischen Blut- diagnostik	35
1.	Blutprobe	35
2.	Präparation des mononukleären Konzentrats	36
2.1	Isolierung der mononukleären Zellen	36
2.2	Zytozentrifugation und Färbung der Prä- parate	37
3.	Hämatologische Differenzierung unter dem Lichtmikroskop	37
4.	Markierung der mononukleären Zellen mit monoklonalen Antikörpern	38

	Seite
4.1 Auswahl der monoklonalen Antikörper	38
4.2 Technik der indirekten Immunfluoreszenz	39
4.3 Differenzierung unter dem Fluoreszenz- mikroskop	40
C. ERGEBNISSE	41
I Analyse der "Large Granular Lymphocytes" (LGL)- Infiltration im Feinnadelaspirat und peripheren Blut	41
1. LGL-Infiltration bei <u>zellulärer Transplantat-</u> <u>reaktion (ZTR)</u>	42
1.1 LGL-Zahl unter Berücksichtigung der "Correc- ted Increment" (C.I.)-Einteilung	43
a) im Feinnadelaspirat (FNA)	43
b) im peripheren Blut (P.B.)	43
1.2 Gegenüberstellung der Ergebnisse aus FNA und P.B.	46
2. LGL-Infiltration bei Virusinfektion (VI)	47
2.1 LGL-Zahl in Relation zur C.I.-Einteilung	47
a) im Feinnadelaspirat	47
b) im peripheren Blut	49
2.2 Gegenüberstellung der Ergebnisse aus FNA und P.B. bei Virusinfektion	49
3. LGL-Infiltration im Vergleich ZTR und Virus- infektion	52
3.1 Vergleich der LGL-Zahlen bei C.I. < 3 (keine ZTR)	52
3.2 Vergleich der LGL-Infiltration innerhalb der Virusgruppen	55
3.3 Vergleich der LGL-Zahlen bei C.I. $\geq$ 3 (ZTR)	56
3.4 Vergleich der LGL-Infiltration innerhalb der ZTR-Virusgruppen	61
3.5 LGL-Prozentsatz im Vergleich ZTR und Virus- infektion	62

3.6	Korrelation der LGL-Zahlen mit immunologischem Monitoring	64
4.	LGL-Infiltration im mononukleären Konzentrat (M.K.)	66
4.1	LGL-Zahlen bei unterschiedlichen Inflamationsgraden	66
4.2	Vergleich zwischen Protozoen-Infektion und Virusinfektion	67
4.3	Korrelation der LGL-Zahlen mit immunologischem Virus-Monitoring	69
5.	Patientenverläufe	71
6.	Zeitliche Korrelation zwischen serologischem Befund, T 4/8 Umkehr und LGL-Anstieg bei Virusinfektion	75
II	Analyse der morphologischen Veränderungen im Feinnadelaspirat unter Immunsuppression während primärem Nierenversagen nach Transplantation	80
1.	Quantitative Auswertung der Feinnadelaspirat-Befunde unter Azathioprin und Cyclosporin A	80
1.1	Nierengewebszellzahl-Verhältnis unter Immunsuppression	81
1.2	Vergleich des Endothel-/Tubuluszell-Verhältnisses mit Kontrollgruppen ohne primäres Nierenversagen	82
1.3	Vergleich der Endothel-/Tubuluszell-Ratio unter Berücksichtigung von zellulärer Inflammation und Virusinfektion	84
2.	Qualitative Auswertung der Feinnadelaspirat-Befunde unter Azathioprin und Cyclosporin A	85
2.1	Gewebszellmorphologie bei primärem Nierenversagen nach Transplantation	85
a)	Gewebszellmorphologie unter Azathioprin-Behandlung (AZA)	85
b)	Gewebszellmorphologie unter Cyclosporin A-Therapie (CsA)	86

	Seite
2.2 "Stanzlöcher" als morphologische Veränderung unter Cyclosporin A	88
a) Vorkommen im Aspirat in Relation zur CsA-Blutspiegel-Höhe	88
b) Häufigkeit typisch vakuolisierter Tubuluszellen pro Aspirat in Relation zu definierten CsA-Blutspiegel-Bereichen	91
2.3 Vergleich der Zellmorphologie-Befunde bei der Therapieformen	92
 D. DISKUSSION	
1. Zu Material und Methoden	95
2.1 Charakteristika der "Large Granular Lymphocytes" (LGL)	99
2.2 LGL bei Abstoßungsreaktion und Virusinfektion	107
3.1 Akutes Nierenversagen bzw. akute Tubulusnekrose im postoperativen Monitoring	120
3.2 Cyclosporin-A-assoziierte Nephrotoxizität Klinik, Feinnadelaspirationszytologie- und Histologiebefunde	124
 E. ZUSAMMENFASSUNG	134
 F. LITERATURVERZEICHNIS	138



ABKÜRZUNGEN

ADCC	- Antibody dependent cellular cytotoxicity
ALG	- Antilymfozytenglobulin
AR	- Akute zelluläre Abstoßungs-Reaktion
ATG	- Antithymozytenglobulin
AZ	- Aspirationszytologie
AZA	- Azathioprin
C.I.	- Corrected Increment
CMV	- Zytomegalievirus
CsA	- Cyclosporin A
CTL	- cytotoxische-T-Lymphozyten
EBV	- Epstein Barr Virus
EDTA	- Ethylene-diamine-tetra-acetate
ELISA	- Enzyme linked immuno sorbent assay
EZ	- Endothelzellen
FNA	- Feinnadelaspirat
FNAC	- Feinnadelaspirationszytologie
FNB	- Feinnadelbiopsie
HLA	- Human leukocyte antigens
HPLC	- High performance liquid chromatography technique
HSV	- Herpes simplex Virus
IgG	- Immunglobulin G
IgM	- Immunglobulin M
IL-2	- Interleukin 2
IFN	- Interferon
KBR	- Komplementbindungsreaktion
KG	- Körpergewicht
kg	- Kilogramm
Leuk.	- Leukozyten
LGL	- Large granular lymphocytes
LICC	- Lecitin-induced cellular cytotoxicity
Ly	- Lymphozyten
MCAK	- Monoklonale Antikörper

MP	- Methylprednisolon
n	- Fallzahl
NGZ	- Nierengewebszellen
NK	- Natural killer cell
K-Zellen	- Killer-Zellen
OKM	- Ortho-Clone-Monocyte MCAK
OKT	- Ortho-Clone-T-Cell MCAK
P.B.	- Peripheres Blut
PMN	- Polymorphkernige Neutrophile, Granulozyten (Polimorph-Nuclear-Cells)
PRIM	- Primärinfektion
RBC	- Red blood cells
RE	- Reinfektion
SD	- Standardabweichung
TZ	- Tubuluszellen
U/min	- Umdrehungen pro Minute
VCA	- Virus Capsid Antigen
VI	- Virusinfektion
VZV	- Varizella Zoster Virus
$\bar{x}$	- Mittelwert
ZTR	- zelluläre Transplantatreaktion

A. EINLEITUNG

Der Einsatz neuer hochpotenter Immunsuppressiva im Rahmen der klinischen Organtransplantation brachte neben offensichtlichen Erfolgen im Sinne einer Steigerung der Transplantationsüberlebensrate auch zusätzliche neue Probleme bzw. keine befriedigende Lösung bestehender Schwierigkeiten (5, 21, 23, 107). Cyclosporin A (CsA) ist dank seiner relativ selektiven, T-Lymphozyten-spezifischen Effekte eines der wirkungsvollsten Immunsuppressiva gegen Transplantatabstoßung (5, 21, 23). In der klinischen Überwachung der medikamenteninduzierten Nebenwirkungen stellen die Cyclosporin-A-Nephrotoxizität und die Verminderung der Infektoresistenz die beiden Hauptkomplikationen dar (21, 92, 119, 132).

Die Elimination von Erregern, wie Viren, Bakterien und Pilzen, die unter Normalbedingungen eine funktionell intakte Immunreaktion der weißen Blutzellen voraussetzten, stellt den Organismus unter Immunsuppression vor schwerwiegende Probleme. Die Infektionen bei transplantierten Patienten zeigen häufig eine atypische Symptomatik und die damit assoziierte Verschlechterung der Nierenfunktion kompliziert die Abgrenzung gegenüber abstoßungsbedingter Alterationen (5). Die Crux dieser Zusammenhänge besteht in der für das Überleben des Transplantats abhängigen therapeutischen Konsequenz. Auch ist die Frage noch offen, ob eine Virusinfektion im Sinne einer Adjuvanswirkung Abstoßungsreaktionen triggert, oder ob abstoßungsbedingte Immunreaktionen die Reaktivierung von latenten Virusinfektionen fördern (9, 113). Als Infektionsquellen können Bluttransfusionen und vor allem die Übertragung von Transplantaten seropositiver Spender auf seronegative Empfänger angesehen werden (5). Im Rah-

men der Infektionsprävention wird neben der aktiven Immunisierung mit Lebendvakzinen eine passive Immunisierung angewandt (49, 158). Letztere wurde bereits erfolgreich bei Patienten nach Knochenmark-Transplantationen eingesetzt. Als sicherste Prophylaxe vor postoperativen Zytomegalie-Infektionen sollte die homogene seronegative Spender/Empfänger-Konstellation angestrebt werden (5, 49). Alle diese Methoden gewähren jedoch noch keinen ausreichenden Schutz vor Virusinfektionen, was die Forderung nach präziser Virusdiagnostik im Hinblick auf die therapeutische Konsequenz unterstreicht.

Eine Verschlechterung der Nierenfunktion nach Transplantation kann abgesehen von zellulärer oder humoraler Abstoßung und Begleitinfektionen sowohl primär als auch konsekutiv durch pathologische Nierengewebsläsionen bedingt sein (103). Das akute Nierenversagen unmittelbar nach Transplantation ist Ausdruck einer ischämischen Schädigung des Organs (61, 123, 147). Cyclosporin A-assoziierte Nephrotoxizität birgt in ihrer klinischen und gewebspathologischen Ausprägung zusätzliche differentialdiagnostische Schwierigkeiten (97, 117, 132). Wiederum entscheidet das causale therapeutische Handeln über das Schicksal des Transplantats. Während das primär akute Nierenversagen bis zur Wiederaufnahme der Transplantatfunktion keiner speziellen Therapie bedarf, erfordert die dosisabhängige Nephrotoxizität eine Reduktion der Immunsuppression (91). Diese wiederum birgt die Gefahr, einer akzelerierten Abstoßungsreaktion den Weg zu öffnen.

Der Teufelskreis dieser komplexen Problematik in der postoperativen Überwachung nach Nierentransplantation kann nur durch effiziente, multifaktorielle Diagnostik durchbrochen werden. Klinisch-technische, laborchemi-

sche, immunologische, cytologische und histologische Methoden liefern aber jeweils nur Teilaspekte. Als Mosaikbausteine setzen sie jedoch das Bild der Gesamtreaktionslage des Transplantats zusammen (107).

Ziel unserer Untersuchungen war es, zusätzliche Parameter zur Früherkennung nephrotoxizitäts- und virusspezifischer Veränderungen auf dem Gebiet der immunologisch-zytologischen Diagnostik zu erstellen. Die Feinnadelbiopsie in Kombination mit der Aspirationszytologie bietet dabei den Vorteil, als wenig traumatische und in kurzen Abständen anwendbare Methode semiquantitativ die Fluktuation der inflammatorischen Zellen des spezifischen und unspezifischen Immunsystems im Transplantat während Abstoßungsreaktion und Begleitinfektion zu erfassen (56, 57, 60, 64, 70, 73).

Die gleichzeitig mögliche gewebsmorphologische quantitative und qualitative Differenzierung erlaubt ischämie-, virus- oder abstoßungsbedingte Alterationen und toxische Schäden zu untersuchen (57, 58, 60, 64). Mit Hilfe zytologisch-immunologischer Bluttests kann durch die Bestimmung lymphozytärer Subpopulationen und ihrer funktionellen Subsets zwischen allogener und antiviraler Immunantwort differenziert werden (33, 73, 159, 160).

B. MATERIAL UND METHODEN

I. PATIENTENGUT

1. Anzahl, Alters- und Geschlechtsverteilung der transplantierten Patienten

Für die folgenden Untersuchungen standen Daten von insgesamt 201 Patienten mit allogenen Nierentransplantationen im Zeitraum von Mai 1981 bis Dezember 1983 zur Verfügung. Von diesen Patienten wurden während ihres stationären Aufenthalts mindestens eine bzw. mehrere Fein-
nadelbiopsien gewonnen und diagnostisch ausgewertet. 128 Patienten (64 %) waren männlich, 73 (36 %) weiblich.

Bei einem Durchschnittsalter von 36,1 Jahren zum Zeitpunkt der Transplantation war der jüngste Patient 10 Jahre, der älteste 60 Jahre alt. Die genaue Altersverteilung gibt die Tabelle 1 wieder.

Tabelle 1: Altersverteilung der transplantierten Patienten

Alter (Jahre)	Patienten (n)	Anzahl in %
10 - 19	16	7,9 %
20 - 29	50	24,9 %
30 - 39	52	25,9 %
40 - 49	50	24,9 %
50 - 59	31	15,4 %
60 - 69	2	1,0 %
Durchschnitt:	Gesamt:	
36,1 Jahre	201	100,0 %

Zur Risikogruppe (107, 108) der über 50jährigen Patienten zählten 16,4 % der Transplantierten, während 7,9 % jünger als 20 Jahre waren. Damit stammen über 3/4 der Patienten aus der Altersgruppe zwischen 20 und 50 Jahren.

2. Art der Transplantation

Von den in die Studie aufgenommenen Patienten erhielten 160 zum ersten Mal ein Nierentransplantat. 33 Patienten erhielten ein Zweittransplantat, 4 Patienten sogar ein Drittransplantat. Zusätzlich zu diesen drei Gruppierungen wurden die Daten von 2 Patienten, die im Beobachtungszeitraum zweimal transplantiert wurden und 2 weiteren Patienten, die sich einer Simultantransplantation von Niere und Pankreas unterzogen, erfaßt (Tab. 2). 3 Patienten erhielten Lebendspendernieren, während alle anderen Transplantate Kadavernieren waren.

Tabelle 2: Anzahl und Verteilung der Transplantationen

Ersttransplantation	160 Patienten
Zweittransplantation	33 Patienten
Drittransplantation	4 Patienten
Erst- und Zweittransplantation	2 Patienten
Nieren- und Pankreastransplantation	2 Patienten

3. Transplantationskriterien

Bei der Empfänger- und Spender-Auswahl war sowohl eine negative Kreuzprobe nach Terasaki (4, 41) als auch eine ABO-Blutgruppenkompatibilität Voraussetzung zur Trans-

plantation.

Inwieweit die HLA-A, -B, -C-Antigensysteme und DR-Antigene von Empfänger und Spender übereinstimmen, bzw. deren Inkompatibilitäten ("mismatches") verteilt sind, zeigt Tabelle 3 (3, 177).

Tabelle 3: Kompatibilität bzw. Inkompatibilität der Transplantationsantigene von Empfänger und Spender

HLA-A, -B, -C "Mismatches"	Fallzahl (n)	HLA-DR "Mismatches"	Fallzahl (n)
0	3	0	77
1	35	1	100
2	74	2	24
3	58		
4	31		

Außerdem wurde das Serum der Patienten vor Transplantation auf präformierte Antikörper untersucht (69). Bei 38 Patienten (23,9 %) fiel der Test positiv aus, d.h. der Patient reagierte im Mittel mit 40,4 % (+ 26,5 %) der im "panel" vorhandenen Lymphozyten. Aufgrund dieses Vorbefunds wurden diese Patienten als Risikogruppe eingestuft.

4. Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz

Anamnestisch und teilweise histologisch konnte die zur Niereninsuffizienz führende Grunderkrankung der Patienten recherchiert werden. In Tabelle 4 sind die Grunderkrankungstypen aufgelistet.

Tabelle 4: Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz

Grunderkrankung	Fallzahl (n)	in %
Chron. Glomerulonephritis	112	55,7
Chron. bakt. Pyelonephritis	22	10,9
Nieren- und Harnwegsmißbildungen	30	14,9
andere Ursachen ¹⁾	23	11,5
unklare Ursachen	14	7,0

1) Patienten mit

1. interstit. Nephritiden (teilw. chem.-toxisch induziert)
2. Diabetes Typ I
3. Gichtnephropathien
4. primärer Amyloidose
5. Urogenital-Tb
6. Schwangerschaftsgestose
7. maligne Nephrosklerose
8. und einige sehr seltene Erkrankungen

Bei der überwiegenden Mehrheit der transplantierten Patienten (55,7 %) führte eine chronische Glomerulonephritis unterschiedlicher Genese (zu 80 % histologisch gesichert) zur dialysepflichtigen Niereninsuffizienz. In 22 Fällen (10,9 %) führte eine chronisch bakterielle Pyelonephritis zum Funktionsverlust des Organs. In 14,9 % waren Nieren- und Harnwegsanomalien (z.B. Hypoplasien mit Reflux und Zystennieren) die Insuffizienzursache. Zu den 23 anderen Ursachen zählen 6 Patienten mit interstitiellen Nephritiden, zum Teil medikamentös induziert; des weiteren 2 Fälle mit Diabetes Typ I, 2 Fälle mit primärer Amyloidose, 3 Gichtnephropathien, 2 Fälle von Urogenital-Tuberkulose, 2 Fälle von Schwan-

gerschafts-Gestose, 1 Fall von maligner Nephrosklerose. Die restlichen 5 Patienten waren an sehr seltenen Nierenleiden erkrankt. In 7 % der Fälle konnte die Grunderkrankung retrospektiv nicht eindeutig geklärt werden.

5. Häufigkeit der Virusinfektionen im Patientengut

Von 24 Patienten, die an serologisch nachgewiesenen Virusinfektionen erkrankt waren, standen uns bewertbare Feinnadelaspirate bzw. mononukleäre Konzentrate zur Verfügung. Die Mehrzahl der Erkrankten (17) litten an einer CMV-Infektion, in 10 Fällen waren es Primärinfektionen, in 7 Fällen Reinfektionen.

2 Patienten wiesen serologisch reine HSV-Reinfektionen auf, 2 weitere Patienten hatten gleichzeitig pathologische Titererhöhungen für HSV- und CMV.

EBV-Reinfektionen ließen sich in 3 Fällen nachweisen (Tab. 5). Während nur 2 CMV-Infektionen bereits im 1. postoperativen Monat auftraten, konnte in 67 %, d.h. in 16 Fällen (11-CMV-, 2-HSV-, 1-CMV + HSV-, 2-EBV-Infektionen) die Diagnose im 2. postoperativen Monat serologisch bestätigt werden. Jeweils 3 Viruserkrankungen wurden im 3. bzw. 4. postoperativen Monat nachgewiesen.

Tabelle 5: Häufigkeit und Art der Virusinfektionen

Infektionsart	Fallzahl	in %
CMV-Infektion ¹⁾	17	70,8
HSV-Infektion	2	8,3
CMV + HSV-Infektion	2	8,3
EBV-Infektion	3	12,5

1) davon 10 Primärinfektionen (= 59 %)
7 Reinfektionen (= 41 %)

II. KLINISCHES DATENGUT

1. Immunsuppressive Therapie

Die Voraussetzung für ein langfristig funktionstüchtiges Transplantat ist die immunsuppressive Therapie zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen des Empfänger-Immunsystems. Im vorgestellten Patientenkollektiv wurde nach zwei unterschiedlichen Therapieprinzipien behandelt. 46 Patienten erfuhren eine Basistherapie mit Azathioprin¹, 155 Patienten mit Cyclosporin-A (CsA)². In beiden Gruppen wurden die Basisimmunsuppressiva mit Methylprednisolon³ in niedriger Dosierung kombiniert. Unter dieser Basistherapie nicht beherrschbare Abstoßungsreaktionen wurden mit sehr hohen Methylprednisolon-Dosen gegebenenfalls mit Anti-Lymphozyten-Globulin (ALG)⁴- oder Anti-Thymozyten-Globulin (ATG)⁵-Gaben behandelt.

1.1 Basisschema der Azathioprin-Therapie

Das seit über 20 Jahren nach Transplantationen eingesetzte Immunsuppressivum Azathioprin ist pharmakologisch gesehen ein Nitroamidazolderivat des 6-Mercaptopurins (5, 20). Die konventionelle Basistherapie nach Nierentransplantation besteht aus dreimonatiger Azathiopringabe in Verbindung mit Methylprednisolon bzw. Pred-

1) Imurek, Deutsche Wellcome GmbH

2) Sandimmun, Sandoz AG, Basel/Schweiz

3) Urbason, Höchst AG

4) Kaninchen ALG, Merieux, Pferde ALG Pressimmun
Behringwerke Marburg

5) ATG, Fresenius München

nisolon; dieser Kombinationstherapie wird eine Steigerung der pharmakologischen Potenz zugesprochen (22, 152). Nach Ablauf des Basis-Dosierungsschemas wird im Erhaltungszeitraum 8 - 12 mg Prednisolon pro Tag (entsprechend 70 kg KG) verabreicht. Die Richtwerte der Dosierung sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6: Richtwertetabelle der Azathioprin-Dosierung

Dosierung	Azathioprin		Glucocorticoid
	mg/kg	Kg/die	mg/die bei 70 kg KG
intraoperativ		5	500 Methylprednisolon
1. - 3. Tag	4 bzw. 2*		120 Prednisolon
4. - 5. Tag	2,5 - 1,5		80 Prednisolon
6. - 7. Tag	2,5 - 1,5		60 Prednisolon
2. Woche	2,5 - 1,5		40 Prednisolon
3. Woche	2,5 - 1,5		36 Prednisolon
4. Woche	2,5 - 1,5		28 Prednisolon
2. Monat	2,5 - 1,5		16 Prednisolon
3. Monat	2,5 - 1,5		12 Prednisolon

* bei Niereninsuffizienz

1.2 Basisschema der Cyclosporin A-Therapie

Die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin A wurde 1976 von Borel et al. erstmals beschrieben (14). Dieses aus 11 Aminosäuren bestehende, zyklische Polypeptid ist ein Stoffwechselprodukt bestimmter Pilzarten und wird mittlerweile synthetisch hergestellt (15). Die Tabelle 7 gibt anhand von Richtwerten die Dosierung im postoperativen Verlauf wieder.

Tabelle 7: Richtwerte der CsA-Basistherapie

Angaben in Klammern beziehen sich auf neue Richtwerte seit Oktober 1983.

	Cyclosporin A		Methylpred-
	MG/kg	KG/die	nisolon mg/die
im 1. postoperativen Monat	15	(14)*	8 (32)
im 2. postoperativen Monat	13	(10)	8 (16)
im 3. postoperativen Monat	11	(8)	8 (8)
Reduktion bis 6. Monat auf (ab 4. postoperativen Monat)	6	(6)	8 (8)

* wenn CsA-Spiegel im Normbereich (300 - 800 ng/ml)

Anpassung der Richtwerte nach aktuellem CsA-Spiegel (21):

CsA-Spiegel 1000 - 1500 ng/ml - Dosisreduktion um
2 mg/kg KG

CsA-Spiegel > 1500 ng/ml - Dosisreduktion um
4 mg/kg KG

Die Radioimmunoassay-Methode (RIA)¹ ermöglichte ab Oktober 1983 eine Cyclosporin A-Blutspiegelbestimmung zur Dosiskontrolle. Die Erstellung neuer Richtwerte erfolgte daraufhin im Rahmen therapeutisch wirksamer Blutspiegel von 300 - 800 ng/ml. CsA-Vollblutkonzentrationen im toxischen Bereich (> 1000 ng/ml) erfordern Dosisreduktionen auf bis zu 4 mg/kg KG (23, 98).

Die Dosis des Kombinationspräparats Methylprednisolon liegt knapp unter der "Cushing Schwelle" und unterliegt entsprechend der CsA-Therapie einer Reduktion im postoperativen Verlauf (38, 161).

1.3 Basistherapie bei Risikopatienten

Die Einstufung als Risikopatient erfolgt nach folgenden Kriterien:

Empfänger von Zweit- und Dritttransplantaten,

Empfänger mit präformierten Antikörpern (höher als 60 %).

Die Basistherapie setzt sich in der 1. postoperativen Woche aus einer Dreier-Kombination (Triple Drug) zusammen:

- Tag 0 - 7 : 15 mg/kg KG Cyclosporin A

- Tag 0 - 3 : 2 mg/kg KG Azathioprin

- Tag 3 - 7 : 1 mg/kg KG Azathioprin

- Tag 0 - 7 : schrittweise Reduktion von 500 mg auf 20 mg Methylprednisolon

Im folgenden postoperativen Verlauf wird die unter 1.2 beschriebene Basistherapie fortgeführt.

1) Cyclosporin RIA KIT^R, Sandoz AG, Basel/Schweiz

1.4 Therapieschema bei Abstoßungskriterien

Die Wahl des Immunsuppressivums und die Höhe der Dosierung richtet sich nach der Häufigkeit des Auftretens einer Abstoßungskrise bzw. nach der Reaktion des Transplantats auf die eingeleitete Therapie.

Die erste Abstoßungskrise in der postoperativen Phase erfährt eine Behandlung mit 500 mg Methylprednisolon täglich über 3 Tage.

Die Therapie der 2. und 3. Krise bzw. bei kontinuierlichem Fortbestehen der 1. und 2. Abstoßungskrise besteht in der Gabe von 1 x 250 mg Methylprednisolon i.v. für maximal 7 Tage.

Bei einer therapierefraktären Krise mit zunehmender Funktionsverschlechterung des Transplantats (Kreatinin > 5 mg %) wird erneut mit ALG oder ATG¹ 7 Tage lang behandelt (18, 19). Außerdem besteht die Möglichkeit einer Therapie-Konversion von CsA- auf Imurek in Kombination mit 40 mg Methylprednisolon/Tag.

1.5 Konversionen

Einige Patienten wurden nach dem Therapieplan routinemäßig auf Azathioprin als Basisimmunsuppressivum konvertiert, andere aufgrund einer therapierefraktären Abstoßungskrise. Es gab auch Umstellungen von Azathioprin

-
- 1) ALG/ATG-Therapie: - 3 Therapiegruppen:
- 2,5 mg/kg KG Kaninchen ATG
- 2,5 mg/kg KG Kaninchen ALG
- 25 mg/kg KG Pferde ALG

auf CsA. Die Feinnadelergebnisse bzw. Nierengewebszellbefunde von Patienten nach Konversion wurden in den folgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt.

2. Kriterien der Abstoßungsdiagnostik

Aufgrund der unterschiedlichen Genese von Transplantatreaktionen unter immunsuppressiver Therapie lassen sich Abstoßungskrisen nur durch eine multifaktorielle Diagnostik verifizieren (107). Die Befundungskonstellationen setzen sich aus klinischen, laborchemischen, histologischen, sonographischen, aspirationszytologischen und nuklearmedizinischen Untersuchungen zusammen. Die Aussagekraft der Feinnadelbiopsie in Kombination mit der Aspirationszytologie rangiert an einigen Transplantationszentren nach nun mehrjähriger Erfahrung gleichwertig mit den histologischen Befunden aus der Stanzbiopsie (11, 101, 104) (ausgenommen: Diagnostik der humoralen Abstoßung).

Die oben angeführten Untersuchungsmethoden dienen nicht nur der Erkennung von Abstoßungskrisen, sondern auch zum Ausschluß differentialdiagnostischer Komplikationen nach Transplantation.

Lymphocelen, Hämatome, Urinome sowie postrenale Abflußbehinderungen lassen sich sonographisch erkennen. Arterielle bzw. venöse Thrombosen der Renalgefäße können durch nuklearmedizinische Verfahren (wie Perfusions-szintigramme) als vaskuläre Komplikationen aufgedeckt werden.

Die Differentialdiagnose Virusinfektion oder Abstoßungskrise konnte bisher nur nach dem klinischen Bild und langwierigen serologischen Tests gestellt werden.

3. Virusinfektionen

Alle Patienten wurden routinemäßig vor Transplantation durch serologische Titerbestimmungen auf frische oder bereits abgelaufene Virusinfektionen hin untersucht. Diese Basisserologie wurde am Institut für Mikrobiologie der LMU-München durchgeführt und setzt sich aus folgenden Untersuchungen zusammen:

- Komplementbindungsreaktion (KBR) bzw. Virenisolierung des Herpes simplex Virus (HSV),
- KBR für Varizellen Zoster Virus (VZV),
- KBR + Enzymimmuntest für Zytomegalie Virus (CMV),
- IgG-Titerbestimmung mit Immunfluoreszenztest für Epstein-Barr-Virus (EBV) bzw. gegen Capsid Antigen (VCA-IgG).

Bei den Komplementbindungsreaktionen werden hauptsächlich die IgG-, teilweise auch die IgM-Titer bestimmt.

3.1 Diagnostik der Virusinfektionen

Bei klinischem Infektionsverdacht wurden neben der Basisserologie zusätzlich Spezialuntersuchungen durchgeführt (CMV-IgM-ELISA-Test und EBV-IgM-Immunfluoreszenztest). Zur Verlaufsbeobachtung wurden in bestimmten Zeitabständen die Titerbewegungen kontrolliert. Als signifikante Richtwerte einer manifesten Virusinfektion galten folgende Titer-Grenzwerte (109, 115, 128):

- CMV-IgM-Titer 1 : 160
- CMV-IgM-Titer 1 : 40 und 4facher KBR-Titer-Anstieg innerhalb von 2 Wochen
- EBV-IgM-Titer 1 : 32 und 4-facher IgG-Titer-Anstieg
- HSV-KBR-Titer - Anstieg um das 4fache

In unsere Untersuchungen gingen nur Werte von serologischen Befunden mit signifikanten Titer-Veränderungen ein.

Die Angaben auf den Untersuchungsformularen des Mikrobiologischen Instituts dienten als Grundlage für unsere Auswertungen.

3.2 Therapie der Virusinfektionen

Die Therapie wird ausgerichtet nach Erregerart und der klinischen Symptomatik bei serologisch nachgewiesenen Virusinfektionen, zum Teil auch nur bei schwerwiegendem Verdacht.

CMV-Infektion: Methylprednisolon bzw. Prednisolon wurde abgesetzt. Die CsA-Dosis wurde zunächst reduziert, notfalls ganz abgesetzt. CMV-Immunglobulin¹ in einer Dosierung von 2 ml/kg KG verabreicht.

HSV-Infektion: Bei schwerer klinischer Symptomatik bestand die Behandlung in einer 5tägigen Gabe von Acyclovir², während die Immun-

1) Cytotect^R, Biotest Pharma, Dreieich, Frankfurt

2) Zovirax^R, Deutsche Wellcome GmbH, Bergwede

suppressiva nicht abgesetzt bzw. reduziert wurden.

EBV-Infektion: Kein Absetzen oder Reduzieren der Immunsuppression. Eine Spezialtherapie stand nicht zur Verfügung. Ansonsten Kontrolle der Titer-Verläufe.

III. METHODE DER FEINNADELBIOPSIE UND ASPIRATIONS- ZyTOLOGIE

Die schon weit über 20 Jahren in der Tumordiagnostik angewandte und bewährte Methode der Feinnadelbiopsie (FNB) in Verbindung mit der Aspirationszytologie (AZ) wurde von P. Häyry et al. seit 1979 (55, 56, 57, 58, 60, 130) auch in die Abstoßungsdiagnostik im Rahmen der Nierentransplantationsforschung eingeführt. Durch diese zytomorphologische Differenzierung und Quantifizierung ließen sich genauere Aufschlüsse über Transplantatreaktionen gewinnen. Durch die Einführung der Methode am Transplantationszentrum München und der konsekutiven zytologisch-immunologischen Auswertung am Institut für chirurgische Forschung konnte die diagnostische Aussagekraft durch die im folgenden geschilderten Untersuchungen weiterentwickelt werden.

1. Biopsische Zellgewinnung aus dem Transplantat

Zur Durchführung der Feinnadelbiopsie wird nach palpatorischer Lokalisation des Nierentransplantats unter

sterilen Cautelen eine Spinalnadel¹ distal der Operationsnarbe ohne Lokalanästhesie durch die Haut in die Nierenrinde vorgeschoben. Zeigt der Nadelkonus plussynchrone Ausschläge, so ist die Feinnadel korrekt plaziert. 5 ml eines steril abgefüllten und mit EDTA versetzten Kulturmediums² werden in eine 20 ml-Spritze³ aufgezogen; diese wird in einen Camecongriff⁴, durch den sich ein konstanter Sog erzeugen läßt, eingespannt und auf die Spinalnadel aufgesetzt.

Unter ständigem Sog und zusätzlichem leichtem Vibrieren wird die Nadel nach mehrmaligen Vertikalbewegungen aus dem Nierenparenchym zurückgezogen. Dadurch werden gleichzeitig Zellen aus mehreren Infiltrationsarealen aspiriert und ein repräsentativer Querschnitt des Parenchyms erfaßt. Das im Nadelkonus verbliebene Zellaspirat wird durch mehrmaliges Spülen in der Kanülenhülse⁵ gewonnen und mit dem restlichen Spritzeninhalt in einem Reagenzglas gesammelt. Normalerweise kann ca. 10 µl repräsentatives Zellmaterial biopsiert werden. Die Biopsiestelle wird anschließend mit sterilem Verband⁶ versorgt.

-
- 1) Spinal-Needle, B-D & Luer Lok, Becton Dickinson & Comp., Größe 90-7, 22 G 3 1/2, Rutherford
 - 2) RPMI-1640 Medium (mit 1 ml 1 M Hepespuffer, 250 mg EDTA/1) bei Fresenius München - steril in 5 ml-Fläschchen abgefüllt
 - 3) Einmalspritzen, B. Braun Melsungen
 - 4) Camecongriff, Camecon AB 8305 Täby Schweden
 - 5) Kanülen, Sterikan B Braun Melsungen
 - 6) Pflasterverband, Klinikapotheke

2. Zellgewinnung aus dem peripheren Blut

Aufgrund der beträchtlichen Organdurchblutung ist eine Blutkontamination im Aspirat unvermeidbar. Zur Korrektur dient eine Referenzprobe aus dem peripheren Blut (p.B.). Dazu wird ein Tropfen Blut aus der Fingerbeere entnommen und in eine Einmalspritze³ aufgezogen; diese Blutprobe wird nun mit 5 ml des oben erwähnten Kulturmediums versetzt.

3. Präparation des Zellaspirats und der Blutprobe

Die weitere Präparation des Feinnadelaspirats (FNA), wie auch der Blutprobe (p.B.) verläuft nun parallel. Das im Kulturmedium suspensierte Zellmaterial kann innerhalb von 1 - 2 Std. zur zytologischen Biopsie-Auswertung und für weitere immunologische Tests herangezogen werden.

3.1 Herstellung des Zytozentrifugenpräparates

Pro Aspirat werden mehrere Präparate hergestellt. Spezielle perforierte und saugfähige Filzkartons⁷ werden zwischen Objektträger⁸ und Zytozentrifugenküvette⁹ in eine Metallvorrichtung eingespannt und so in der Zytozentrifuge⁹ plaziert, daß die Gewichtsverhältnisse aus-

7) Filter Cards, Cat. No. 599 x 45, Shandon

8) Objektträger, 76 x 26, R. Langenbrinck, Emendingen

9) Zytozentrifuge mit Küvetten, Cytospin II, Shandon
Labortechnik GmbH, Frankfurt

geglichen sind.

Bis zu 200 µl der Zellsuspensionen werden mit Hilfe von Eppendorfpipetten¹⁰ in die entsprechenden Küvetten gefüllt und anschließend 5 Minuten lang bei 500 U/min bzw. 300 g zentrifugiert.

Auf dem Objektträger sammelt sich das Zellmaterial auf einer kleinen kreisförmigen Fläche. Vor Anfärbung wird deren Dichte lichtmikroskopisch¹¹ bei 10facher Vergrößerung kontrolliert.

Die als Ring erkennbaren Erythrozyten, die deutlich körnig reflektierenden Leukozyten und die im Aspirat vorhandenen Parenchymzellen sollten einzeln nebeneinander liegen. Ist das Präparat zu dicht geraten, kann durch entsprechende Verdünnung der Suspension optimale Verteilung erreicht werden.

Falls dagegen sehr wenig Biopsiematerial gewonnen wurde, kann durch sanfte Abzentrifugation¹² im Reagenzglas und Resuspension des Bodensatzes mit 500 µl 0,9 %iger Kochsalzlösung eine geeignete Zelldichte auf dem Präparat gewonnen werden.

Nach Lufttrocknung werden die präparierten Objektträger gefärbt.

3.2 Färbemethodik nach Pappenheim

Nur an gefärbten Präparaten ist eine exakte morphologische Differenzierung von Leukozyten und Parenchymzellen

10) Eppendorf-Pipette 3130, Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg

11) Zeiss Universal Mikroskop, mit Objektiven, Standard 18, Zeiss, Oberkochen

12) Zentrifuge Rotanda S für Zentrifugation bis 4500 U/min, Firma Hettich, Tuttlingen

in Aspirat und Blutprobe möglich.

Bei der Färbemethode nach Pappenheim werden die luftgetrockneten Präparate waagrecht auf eine Färbebank gelegt, vollständig mit unverdünnter May-Grünwald-Lösung¹³ überschichtet und 3 Minuten lang fixiert. Danach wird die Lösung mit Aqua bidest¹⁴ abgespült und diese für 1 Minute auf den Objektträgern belassen. Anschließend werden für weitere 30 Minuten jeweils frisch filtrierte, im Verhältnis 1:20 mit Aqua bidest¹⁴ verdünnte Giemsa-Lösung¹⁵ aufgetragen.

Nach abgelaufener Färbezeit erfolgt Spülung und daraufhin Lufttrocknung.

Die nicht beschichteten Flächen der Objektträger werden mit Salzsäure-Äthanol-Lösung¹⁶ gesäubert. Ein mit Eukitt¹⁷ fixiertes Deckplättchen¹⁸ auf dem zentrifugierten Areal konserviert das Zellmaterial.

4. Befundung des Zellaspirats

Mittels hämatologischer Routinedifferenzierung werden normale mononukleäre Zellen und deren Aktivierungsstufen sowie Parenchymzellen des Nierengewebes befundet (67, 75, 178).

13) May-Grünwald-Stammlösung, E. Merck, Darmstadt

14) Aqua bidest, aus zentraler Zuleitung

15) Giemsa-Lösung, E. Marck, Darmstadt

16) Salzsäure-Äthanol-Lösung, Klinikapotheke

17) Eukitt, O. Kindler, Freiburg i.Br.

18) Deckplättchen aus Glas, 18 x 18 mm, Firma Menzel

4.1 Lichtmikroskopische Auswertung der Präparate

Die Blut- und Gewebszellen werden mit einem Universal-Mikroskop¹¹ differenziert. Zur Erleichterung der prozentualen Auszählung der Zellen dient ein Zählapparat¹⁹. Zelldichte und Qualität der Präparate werden zuerst bei 120facher Vergrößerung, anschließend Häufigkeit und Aktivierungszustand leukozytärer Zellsorten bei 400facher Vergrößerung beurteilt. Nach Aufsuchen repräsentativer Regionen, z.B. Parenchymzellverbände im FNA, wird bei 1200facher Vergrößerung mit Immersionsöl das jeweilige Präparat quantitativ ausgewertet; um eine repräsentative Zellverteilung zu erhalten, sollte das Präparat mänderrförmig inspiziert werden. Sinnvoll ist es außerdem, zuerst die meist zellärmere periphere Blutprobe morphologisch zu befunden, um anschließend die verschiedenartigen Zellpopulationen der Leukozyten, deren aktivierte Formen und die Gewebszelltypen im FNA genau identifizieren zu können.

Im Zytozentrifugenpräparat des peripheren Blutes werden 3 x 100 leukozytäre Zellen ausgezählt und deren Mittelwerte registriert. Ebenso verfährt man mit dem FNA-Präparat, befundet dabei aber gleichzeitig ins Blickfeld tretende Nierengewebszellen morphologisch gesondert und bestimmt deren Anzahl pro 100 Leukozyten. Ein repräsentativer Ausstrich eines bewertbaren Feinnadelaspirats sollte ca. 10 - 30 % Parenchymzellen enthalten.

19) Zählgerät, Leukodiff 600, Instrum. Laboratory
Boskamp GmbH

4.2 Differenzierung der Zellen

Als zytologische Kriterien der hämatologischen Differenzierung dienten die Beschreibungen von Begemann et al. (10, 75), E. v. Willebrandt (185, 186) und P. Hägry (57, 60). Sie waren die Grundlage zur Beurteilung von Zellen der Lympho- und Granulopoese, deren aktivierten Reizformen, der Monozyten sowie der aus verschiedenen Funktionsabschnitten des Nierenparenchyms stammenden Zellen.

a) Differenzierung nach myelo-lymphopoetischer Abstammung

Myeloische Reihe:

Juvenile Granulozyten: Der Zelldurchmesser beträgt 12 - 16 µm. Der meist bohnenförmige Kern ist violett und schollig strukturiert. Eine spezifische Granulation im hellen Zytoplasma bedingt die Einteilung in neutrophile, basophile und eosinophile Metamyelozyten.

Stabkernige Granulozyten: sind 10 - 16 µm groß, blaß-rosa und haben ein granuliertes Zytoplasma. Der violett gefärbte Zellkern ist stabförmig, meist gebogen, mit Einschnürungen, die definitionsgemäß 1/3 der durchschnittlichen Kerndicke nicht überschreiten sollen.

Segmentkernige Granulozyten: sind 10 - 15 µm große Zellen mit mehreren über fadenförmigen Brücken verbundenen Kernsegmenten. Das grobkörnige Kernchromatin ist rötlich-violett gefärbt, das Zytoplasma blaßrosa. Je nach Granulationsart erfolgt die Einteilung in neutrophile basophile und eosinophile Granulozyten.

Monozyten: besitzen als 15 μm (kleine M) bis zu 20 μm (große M) große Zellen einen randständigen ovalen bis nierenförmigen, teils auch vielfältig gelappten Zellkern mit retikulärer Chromatinstruktur. Das reichliche, tau-benblaue Zytoplasma weist bei Phagozythosetätigkeit Vakuolen auf. Je nach Reifungsgrad werden sie in Monoblasten, Monozyten und Makrophagen eingeteilt.

Makrophagen: haben eine Zellgröße zwischen 15 - 25 μm mit starker polymorpher Kernverformung (Lappung) und gelockertem Kernchromatin und Kernvakuolisierung. Das bläulichgraue Zytoplasma ist unregelmäßig vakuolisiert, hat zytoplasmatische Ausläufer und läßt Einschlusskörper und Granulation erkennen.

Lymphatische Reihe:

Kleine Lymphozyten: sind kleine runde Zellen mit einem Durchmesser von 7 - 10 μm . Der runde, dicht strukturierte Zellkern nimmt fast die ganze Zellfläche ein. Der schmale Zytoplasmasaum ist hellblau angefärbt.

Große Lymphozyten: Ihr Zelldurchmesser beträgt 10 - 16 μm , Der rund bis oval geformte, randständig gelegene Zellkern zeigt nach der Färbung dichtgeschichtetes Chromatin. Der Zytoplasmasaum ist im Vergleich zu kleinen Lymphozyten deutlich verbreitert.

Große granulierte Lymphozyten: Phänotypisch entsprechen diese Zellen mit einer Zellgröße von 10 - 16 μm den großen Lymphozyten. Typisch für diese Zellart ist der nierenförmige, schollig strukturierte Kern, in dessen Kernbucht und perinukleär azurophile Granula im bläulichen Zytoplasma auftreten (Abb. 1 und 2).

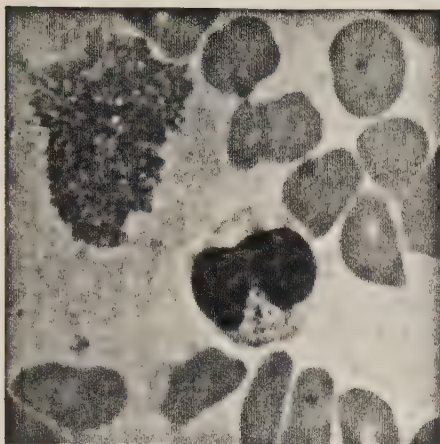


Abb. 1:

LGL im Feinnadel-
aspirat mit azuro-
philen Granula in
der Kernbucht

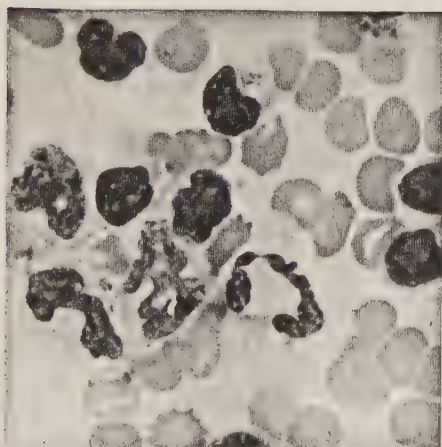


Abb. 2:

LGL im mononukleä-
ren Konzentrat, da-
neben Lymphozyten,
Monozyten und
Granulozyten

Plasmazellen: Der Durchmesser der ovalgeformten Zellen beträgt zwischen 7 und 15 μm . Definitionsgemäß weist der exzentrisch gelegene dunkelviolettfarbene Zellkern die typische Radspeichenstruktur des Chromatins auf. Die Zellen stechen besonders durch ihr tiefblaues teils vakuolisiertes Zytoplasma mit perinukleärer Aufhellung ins Auge.

Lymphatische Reizformen:

Aktivierte Lymphozyten: Der Zelldurchmesser dieser Prä-lymphoblasten entspricht 10 - 16 μm . Die Kern-Plasma-Relation hat sich deutlich zugunsten des Zytoplasmas verschoben. Das Kernchromatin ist schollig aufgelockert, teils sind Nucleoli erkennbar. Das Zytoplasma ist stark basophil gefärbt. Die aktivierten Zellen unterscheiden sich von den reifen Lymphozyten vor allem in Größe, Kernstruktur und Basophilie.

Lymphoblasten: Mit 25 - 30 μm Zelldurchmesser besitzen diese im stark aufgelockerten Kernchromatin einen meist deutlich sichtbaren Nucleolus. Das stark basophile Zytoplasma zeichnet einen stimulierten Lymphoblasten aus. Intensiv basophiles, tiefblaues Zytoplasma bei sonst gleicher Kernstruktur und eventuell zytoplasmatische Vakuolisierung deuten auf einen B-Lymphoblasten bzw. Plasmablasten hin.

b) Differenzierung nach parenchymatöser Herkunft

Im FNA kommen neben den mononukleären Blutzellen auch die Parenchymzellen der Transplantatniere vor und werden nach Zelltyp, Größe, Zustand, Anzahl und Verteilungsmuster bzw. Auftreten von Zellverbänden unterschieden (147).

Endothelzellen: entstammen mittleren und kleineren Gefäßen und Kapillaren der Nierenrinde. Ihr Durchmesser beträgt bis zu 30 µm; der Kern ist rundlich bis oval, zart rötlich-violett gefärbt mit grobkörnig - lockerem Chromatin in einem schlecht abgrenzbaren, sehr hellen Zytoplasma; meist sind bis zu 4 blaß-blaue Nukleoli sichtbar.

Proximale Tubuluszellen: Die Zellen des proximalen Konvoluts sind ca. 15 µm groß. Der rundliche, exzentrisch gelegene Zellkern ist dunkel basophil mit netzig-strukturiertem Chromatin.

Distale Tubuluszellen: Der Zelldurchmesser beträgt 20 - 25 µm. Der große, runde, zentral gelegene Zellkern ist durch eine aufgelockerte, typisch körnige Chromatinstruktur und durch einen deutlich dunkleren basophilen Nukleulus charakterisiert. Zellkern und Zytoplasma erscheinen merklich heller basophil im Vergleich zur proximalen Konvolutzelle. Trotz zytoplasmatischer Ausläufer ist der bläulich-graue Plasmasaum gut abgrenzbar. Neben den großen, klaren Tubuluszellen können auch azurophil bis gräulich granulierte Tubuluszellen auftreten.

Glomerulumzellen: Sind sehr kleine Gewebszellen (5 - 12 µm), die meist in Verbänden vorkommen. Sie sind im FNA sehr selten sichtbar. Der kleine runde Kern ist tiefblau, das klare blasse Zytoplasma enthält keine Granula.

Für den Gewebszellbefund werden alle intrazellulären Veränderungen, wie Schwellung, Vakuolisierung, verschiedene Granulierungen, Phagozytosezeichen (Einschlüsse), Karyolyse u.a. dokumentiert. Diese Aussagen über

ein FNA erlauben Rückschlüsse auf pathologische Vorgänge im Transplantat, seien sie toxischer, ischämischer oder inflammatorischer Natur (71).

4.3 Errechnung des zellulären Infiltrats im Transplantat

Nach den von P. Häyry et al. (55, 59, 60, 185) erarbeiteten Richtlinien werden die lichtmikroskopisch differenzierten leukozytären Subpopulationen von FNA und Blutprobe in einem Bewertungsbogen (Abb. 3) tabellarisch erfaßt. Seit Einführung der Methode wurde dieser Bewertungsbogen im Rahmen von internationalen Feinnadel-Workshops verbessert und ergänzt. Neueste Erkenntnisse über zelluläre Abstoßungsreaktionen veranlaßten exaktere Differenzierung der leukozytären Subpopulationen und spezifische Gewichtung der inflammatorischen Potenz einzelner Zellgruppen.

Da die Beurteilung des zellulären Infiltrats im Transplantat durch unterschiedlich große Kontamination des FNA mit Leukozyten des zirkulierenden p.B. (d.h. aspiriertes Blut aus Nierengefäßen) verfälscht ist, bedarf dies einer Korrektur der gemittelten prozentualen Zellzahlen. Durch Subtraktion der entsprechenden Zellpopulation des p.B. von jenen des FNAs errechnet sich die Zusammensetzung der tatsächlich in der Niere angereicherten Zellen. Der Differenzwert wird als "Inkrement" bezeichnet (58). Diese semi-quantitative Berechnungsmethode liefert eine Aussage über das Ausmaß der reinen zellulären Transplantatinfiltration.

Abb. 3: Bewertungsbogen für routinemäßige FNB-Befundung

Transplantationszentrum
 Inst. f. Chirurgische Forschung
 Klinikum Großhadern
 Universität München

Biopsie Nr.
 Datum:
 Tag post Tx:

Pat.-Name: _____ Nr.: _____ Tag der Tx: _____

Zusammenfassung der wichtigsten klinischen Daten:

Parameter: vorgestern gestern heute	Klinische Bewertung der Tx-Funktion
Temperatur	Verlauf: stabil besser schlecht
S.-Creat.	ATN
Urinmenge	Abstoßung
HP	Virusinfekt
CyA	ES-Toxizität
ALG/ATG	Stanzbiopsie

Klinische Bemerkungen, Probleme: _____

Ergebnisse (MGG)

	FNAB	Blut	Incr.	CF	CI.	
100 %	Lymphoblasten			1.0		Gesamt C. I.
	Plasmabl. u. Plasmaz.			1.0		
	aktivierte Lymphoz.			0.5		
	LGL			0.2		
	Lymphozyten			0.1		
	PMN: Juvenile Formen			0.1		
	Neutrophile			0.1		
	Eosinophile			0.1		
	Basophile			0.1		
	Monoblasten			1.0		
	Monozyten			0.2		
	Makrophagen			1.0		
	Andere			0.0		
Gewebezellen:	Endothelzellen	Morphologiewert 4: EC:				
	Tubuluszellen	TC:				
	Andere					

⁵ Leukozyten-(MGG)-Differenzierung beträgt 100 %. Gewebezellen werden im gleichen Gesichtsfeld ausgezählt, aber nicht in das Differentialblutbild einbezogen.

⁴ TC-Morphologiewert: 0 = keine Veränderung; 1 = Schwellung; 2 = Schwellung und Vakuolisierung; 3 = Schwellung, Vakuolisierung und Einschlüsse (z. B. Erythrophagozytose); 4 = Nekrose

Bewertung:

4.4 Qualitative Wertung der Infiltration durch das "Corrected Increment"

Retrospektive Analysen der o.g. Arbeitsgruppe zeigten außerdem, daß vor allem den aktivierten Zelltypen bei Abstoßungsreaktionen eine bedeutende Rolle zufällt. Entsprechend ihrer immunologischen "Potenz" wurde jedem Zelltyp ein entsprechender Faktor zugeteilt (Tab. 8) (55, 59, 60, 102, 147, 160, 185). Durch Multiplikation des Increments mit dem Korrekturfaktor errechnet sich das sogenannte "korrigierte Inkrement". Je aggressiver die immunkompetenten Zellen auf das Transplantat reagieren, desto höher fällt dieser Wert aus. Diese qualitative Wertung präzisiert die semiquantitative Aussage des Inkrements und läßt das Ausmaß und den Verlauf zellulärer Transplantatreaktionen erfassen.

Tabelle 8: Korrekturfaktoren zur Errechnung des "Corrected Increments" entsprechend der geschätzten immunologischen Potenz jeder Zellgruppe

Lymphoblast / Plasmablast	1,0
Aktivierter Lymphozyt	0,5
Large Granular Lymphocyte (LGL)	0,2
Lymphozyt	0,1
Granulozyten (PMN)	0,1
Monoblast	1,0
Monozyt	0,2
Makrophage	1,0

4.5 Graduierung der zellulären Transplantatreaktion

Die Summe der aus den einzelnen Zellgruppen ermittelten und durch den entsprechenden Faktor korrigierten Increments wird mit dem Begriff "Corrected Increment" (C.I.) als Zahlenwert registriert und dient als verifizierte Größe der zellulären Transplantat-Reaktionen (ZTR). Die Einteilung der "Akuten zellulären Reaktion" (AR) in ihre Schweregrade 0, I, II, III und ihre Übergangsstufen wurde in folgender Bewertungsskala festgelegt:

AR	0	C.I.	< 0,5
AR	0 - I	C.I.	0,5 - 1,5
AR	I	C.I.	1,5 - 3,0
AR	I - II	C.I.	3,0 - 4,5
AR	II	C.I.	4,5 - 8,0
AR	II - III	C.I.	> 8,0
AR	III	- zusätzlich von Gewebsebefund, Monozyten und Makrophagenzahl abhängiges C.I.	

Die Bewertungsgrade der zellulären Reaktionen unterliegen fließenden Übergängen. In der zeitlichen Verlaufskontrolle einzelner Patienten war die Einteilung in Übergangsstufen (z.B. AR I - II) notwendig geworden, um tendenziöse Schwankungen sichtbar zu machen.

Dennoch können die entsprechenden Schweregrade der Transplantatreaktionen klar abgegrenzt und folgendermaßen charakterisiert werden (58, 61, 70, 72, 102):

Einteilung der zellulären Transplantatreaktionen:

- AR 0 - keinerlei Anzeichen einer zellulären Infiltration nachweisbar.
- AR I - leichte Lymphozytenvermehrung, läßt auf beginnende oder abklingende Zellreaktion schließen.
- AR II - entspricht einer voll ausgeprägten Transplantatreaktion, mit überwiegend lymphozytären Reizformen
- AR III - späte, meist irreversible, zelluläre Abstoßungsreaktion, hoher Anteil an Monozyten und Makrophagenaktivität, kombiniert mit schwerem Parenchymschaden.

4.6 Bewertung der Parenchymzellen

a) Quantitative Erfassung

Routinemäßig wurde neben der Erfassung des leukozytären Zellinfiltrats gleichzeitig ein Bewertungsbogen für den Gewebszellbefund geführt (Abb. 4).

Für die Beurteilung der Feinnadelbiopsie ist primär die Parenchymzellzahl pro 100 ausgezählten Leukozyten entscheidend. Ein Präparat gilt nur dann als repräsentativ, wenn mehr als 10 Nierengewebszellen, bestehend aus Tubuluszellen und Endothelzellen, pro 100 Leukozyten im Aspirat vorhanden sind (57, 189).

Im nächsten Schritt wird die Qualität der aspirierten Zellsuspension vermerkt. Als Kriterien dienen die Dichte der Gewebszellverteilung im Aspirat, die "Nässe" der Biopsie, d.h. die offensichtliche Stärke der Blutkontamination und die Notwendigkeit der Abzentrifugation zur Zellgewinnung aus einer extrem dünnen Zellsuspension.

Abb. 4

GEWEBSBEFUND	FNB-Nr.	Datum
--------------	--------------	-------------

NGZ-Zahl / pro 100 Leukozyten :	EZ
	TZ

FNA-Qualität :	☐ dicht ☐ "naß" (= blutig) ☐ Absentrifugation nötig
----------------	--

Coulter Counter Faktor :

NGZ-Qualität :

EZ	TZ					
			intakt			
			lysiert			
		Z Y T O P L A S M A		☐ leicht		
			Schwellung	☐ mittel		
				☐ stark		
				☐ leicht	☐ grobbl.	☐ feinblasig
			Vakuolisierung	☐ mittel	☐ klar	☐ schlierig
			☐ stark	☐ regelm.	☐ unregelm.	
			Stanzlöcher (punch holes)			
			Zytoplasmainschlüsse			
			Erythrophagozytose			
			Granulationen			
		Z E L L K E R N	intakt			
			Kernentrundung			
			Pyknose			
			Karyolyse			
			Schwellung			
			Vakuolisierung			
			Regenerationszeichen			

Zur Kontrolle der Biopsiebewertbarkeit wurde seit Anfang 1983 von jedem Aspirat und der entsprechenden Blutprobe eine Coulter Counter-Messung²⁰ durchgeführt. Auf das Arbeitsprinzip und seine Anwendungsmethode wird im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen. Ich verweise hier auf die Promotionsarbeit von Ch. Koller (100, 102). Mit Hilfe eines errechneten Faktors ist es möglich, exakt das Ausmaß der Kontamination jedes Aspirats mit peripheren Blutleukozyten zu bestimmen und somit rechnerisch die Bewertbarkeit einer Feinnadelbiopsie festzulegen.

b) Qualitative Erfassung

Auf dem zweiten Teil des Erfassungsbogens wird die Parenchymzellqualität dokumentiert. Differenziert nach Zellart (TZ u. EZ) sind pathologische Veränderungen in Zytoplasma und Zellkern getrennt aufgelistet. Die Gewebszellen werden auf ihren Schwellungszustand und ihre Art der Vakuolisierung hin untersucht. Spezielles Augenmerk wird auf zytoplasmatische Veränderungen, wie Stanzlöcher (eine typische Form der Vakuolisierung) gerichtet. Ebenfalls werden Phagozytosezeichen und Granulationen vermerkt. Gravierende Zellschäden sind pathologische Zellkernveränderungen, wie Entrundung, Schwellung, Vakuolisierung bis hin zur Karyolyse.

Diese differenzierten Befunde dienen vornehmlich wissenschaftlichen Auswertungen. Die klinische Aussage beschränkt sich auf eine vereinfachte Werteskala (s. Befundbogen unter 4.3, Abb. 3).

20) Coulter Counter Model ZM, Counter Electronics GmbH, Krefeld

Der Morphologiewert von

0 = keine pathologische Veränderung

1 = Zellschwellung

2 = Schwellung und Vakuolisierung

3 = Schwellung, Vakuolisierung und Phagozytose-tätigkeit

4 = Zellnekrose

gibt das Maß der pathologischen Schädigung im Gesamt-
überblick wieder.

Der handschriftliche Schlußbefund schafft einen Über-
blick über die differenzierte zelluläre Transplantat-
reaktion (ZTR) und den davon abhängigen oder unabhä-n-
gigen Gewebszellbefund. Spezifisch einzuordnende Abnormi-
täten, wie überproportional hohe Werte einer speziellen
Zell-Subpopulation oder eine besondere Form der Gewebs-
zell-Vakuolisierung werden dem Kliniker in diesem Ab-
schnitt zusätzlich mitgeteilt.

IV. METHODEN ZUR ZYTOLOGISCHEN-IMMUNOLOGISCHEN

BLUTDIAGNOSTIK

1. Gewinnung der Blutprobe

Zur Untersuchung dient 5 ml venöses Blut, das den trans-
plantierten Patienten morgens vor deren Medikation ab-
genommen wird. Die Blutprobe wird mit 50 I.E. Heparin
antikoaguliert und bis zur Bearbeitung im Kühlschrank
bei 4°C gelagert.

Besteht bei Patienten der Verdacht auf eine systemische

Virusinfektion, wird auch ohne gleichzeitige Feinnadelbiopsie 5 ml Heparinblut entnommen und zur Untersuchung ins Institut versandt.

2. Präparation des mononukleären Konzentrats

2.1 Isolierung der mononukleären Zellen

Nach Anfertigung von 2 Blutausstrichen zur Auszählung des Differentialblutbildes wird die heparinisierte Blutprobe im Verhältnis 1:1 mit Tris-Hank'scher Lösung²¹ verdünnt und in einem Plastikreagenzglas über 2-3 ml Ficoll-Isopaque-Lösung²² mit einer spezifischen Dichte von 1,077 g/ml geschichtet. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 1200 G (entspricht 2800 Umdrehungen/min in der Rotanda-S-Zentrifuge¹²) erscheint das sogenannte "mononukleäre Konzentrat" als Interphasenring zwischen Ficoll-Lösung und Serum (13).

Dieses Konzentrat besteht im wesentlichen aus Lymphozyten und Monozyten, während die restlichen Blutzellen, wie Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten ihrem höheren spezifischen Gewicht entsprechend den Bodensatz bilden.

Der Interphasenring wird schonend mit einer Pasteurpipette abgetragen, in Tris-Hank'scher Lösung resuspendiert und 3mal bei 600 G (entspricht 1400 U/min) je 5 Minuten gewaschen.

21) Tris-Hank'sche Lösung, pH 7,4, Klinikapotheke

22) Ficoll-Hypaque-Lösung, 1,077 g/ml, Klinikapotheke

Das gewonnene Zellkonzentrat wird anschließend zur Weiterverarbeitung auf $1 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

2.2 Zytozentrifugation und Färbung der Präparate

Die Methode zur Herstellung der Zytozentrifugenpräparate wurde unter III/3.1 bereits beschrieben. Für die Präparation werden 10 bis 20 µl des Zellkonzentrates in die Küvetten der Zytozentrifuge pipettiert und mit 150 µl Hank'scher Lösung verdünnt. Nach 5minütiger Zentrifugation (500 U/min) wird gleichfalls die Zelldichte auf dem Objektträger kontrolliert und gegebenenfalls durch entsprechende Verdünnung optimiert. Die Färbung der Blutaussstriche und der Zytozentrifugenpräparate erfolgt nach der Methode von Pappenheim (s. III/3.2).

3. Hämatologische Differenzierung unter dem Lichtmikroskop

Die gefärbten Präparate des mononukleären Konzentrats werden nach den gleichen zytologischen Kriterien, wie unter III/4.1 und III/4.2 beschrieben, differenziert. 3×100 mononukleäre Zellen werden pro Präparat ausgezählt. Die Prozentzahlen der lymphozytären und monozytären Subpopulationen werden gemittelt und tabellarisch erfaßt.

4. Markierung der mononukleären Zellen mit monoklonalen Antikörpern

Zusätzlich zur panoptischen Unterscheidung der Lymphozyten-Subpopulationen im "mononukleären Konzentrat" diene die differenziertere immunologische Technik mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (99, 180). Diese hochspezifischen Antikörper sind mittlerweile in diagnostischen und therapeutischen Verfahrensweisen der Transplantationsforschung etabliert (33, 160).

4.1 Auswahl der monoklonalen Antikörper (MCAK)

Aus einem vielfältigen Angebot von MCAK²³ gegen Membranantigene der Lymphozyten bzw. deren Subpopulationen wurden folgende MCAK ausgewählt:

OKT 3¹ - Dieser Antikörper bindet an Membranstrukturen von reifen Thymozyten und nahezu sämtlichen peripheren T-Lymphozyten (26, 138), die dadurch in vitro-proliferativ stimuliert werden (179).

OKT 4² - Helfer- und Inducerzell-Populationen der T-Lymphozyten werden mit OKT 4 selektiv markiert (137, 139).

Helferzellen sind zur Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten und Suppressor-T-Lymphozyten erforderlich (170). Ferner induzieren OKT 4 positive Zellen die Ausreifung von B-

23) -1), 2), 3) Orthoclone OKT, Warenbezeichnung der Fa. Ortho Pharmaceutical Corp., Raritan, N.J:08869, USA

Lymphozyten zu IgG-produzierenden Plasmazellen (141).

O_KT 8³ - Dieser Antikörper koppelt an Membranantigene der zytotoxischen und Suppressor-T-Lymphozyten (137, 140).

Eine Differenzierung ihrer Suppressor- oder zytotoxischen Funktion ist derzeit durch spezifische Antikörper nicht möglich. Die Suppressor-Aktivität bezieht sich auf T-T-Zell- wie auch auf T-B-Zell-Interaktionen.

4.2 Technik der indirekten Immunfluoreszenz

Die Lymphozyten-Subpopulationen werden mit Hilfe einer 2-phasigen Antikörper-Kopplung markiert. Bei dieser sogenannten "indirekten Immunfluoreszenz-Methode" bindet der spezifische primäre Antikörper (MCAK) an das Membranantigen der Lymphozyten (6). Der zweite mit Fluoreszein konjugierte Antikörper koppelt an die Antigenstruktur des primären Antikörpers und ermöglicht durch diese sichtbare fluoreszierende Zellmarkierung die mikroskopische Auswertung.

Die lyophilisierten monoklonalen Antikörper werden steril in 1 ml Aqua dest. gelöst und 1:100 mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt. Jeweils 100 µl der mononukleären Zellsuspensionen werden mit 30 µl der entsprechenden primären Antikörperlösung (IgG-Antikörper aus klonierten Mäusezellen²³) bei 4°C 45 Minuten angesetzt. Nach dieser Inkubationszeit entfernt man den nicht zellgebundenen Rest der Antikörper durch Auswaschen mit isotoner Kochsalzlösung und Zentrifugation bei 300 G.

Als zweiter Antikörper dient ein mit Fluoreszein konjugiertes Anti-Maus-Immunglobulin²⁴. Nach einer 1:10 Verdünnung werden 30 µl der Anti-IgG-Lösung zum einphasig-antikörpergebundenen Zellkonzentrat getropft und bei 4°C im Kühlschrank für 45 Minuten inkubiert. Nach erneutem Auswaschvorgang und Aufschwemmung der Zellen mit 50 µl isotoner Kochsalzlösung erfolgt die Auszählung der markierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Zur Kontrolle einer unspezifischen Zellmarkierung versetzt man das mononukleäre Konzentrat nur mit dem sekundären Antikörper und registriert eine eventuell auftretende Zell-Fluoreszenz als Korrekturwert.

4.3 Differenzierung unter dem Fluoreszenzmikroskop

Ein Zeiss-Fluoreszenz-Mikroskop²⁵ dient zur Auswertung der markierten mononukleären Zellen. Ein kleiner Tropfen der Zellsuspension wird auf einen Objektträger pipettiert und unter einem Deckgläschen ausgebreitet. Bei 400facher Vergrößerung (unter Verwendung einer Halogenlampe und Spezial-Lichtfilter²⁵) erscheinen die Zellen im Dunkelfeld des Öl-Inversionskondensors rot. 2 x 100 Zellen werden pro Präparat ausgezählt und dabei der prozentuale Anteil der grün fluoreszierenden Zellen bestimmt. Das Auftreten einer besonders intensiven, einseitig lokalisierten Zellfluoreszenz, das sogenannte "capping", kommt durch die Ansammlung der markierten Oberflächenantigene an einem Zellpol zustande (93).

24) Goat-Anti-Maus IgG-FITC, code No G 250, Tago Inc., Brulingname CA 94010, USA

25) Zeiss Universal Fotomikroskop, Fa. Zeiss, Oberkochen
- Halogenleuchte 12 V, 100 Watt
- Zeiss, Kondensor 1,2/1,4
- Objektive: PH 2, Plan 40/0,65 160/0,17
- KP 500 Kurzpassfilter, BG 38 Rotfilter

D. ERGEBNISSE

I. ANALYSE DER LGL-INFILTRATION IM FEINNADELASPIRAT UND PERIPHEREN BLUT

Ab Oktober 1982 wurden im aspirations-zytologischen Monitoring routinemäßig die Anzahl der LGL pro 100 Leukozyten bestimmt und deren immunologische Wertigkeit bei zellulärer Transplantatreaktion (ZTR) im "corrected increment"-Faktor berücksichtigt.

In die Studie gehen Werte von 223 repräsentativen Feinnadelbiopsien (FNB) ein; 184 Feinnadelaspirate stammen von Patienten während unterschiedlicher ZTR, 39 FNA wurden von Patienten mit serologisch nachgewiesenen Virusinfektionen zum Zeitpunkt der Zellmaterialentnahme ausgewertet.

Alle Patienten dieser Studie wurden ausschließlich nach dem CSA-Basis-Schema behandelt.

Die Zusammenfassung aller Daten der LGL-Auszählung ergab die in Tabelle 9 aufgelisteten Werte-Paare für FNA und peripheres Blut.

Während bei Patienten ohne Infektion im Durchschnitt 2,6 LGL im Aspirat bzw. 0,5 LGL im peripheren Blut auf 100 Leukozyten gezählt wurden, ergaben sich weitaus höhere Werte für das Kollektiv mit Virusinfektion (FNA = 7,4 LGL/P.B. = 3,6 LGL).

Unter Berücksichtigung des "Increments" infiltrierten somit durchschnittlich 4 LGL das Transplantat unter Infektionsbedingungen, dagegen befanden sich rein rechnerisch in der Vergleichsgruppe 2 LGL in situ.

Diese globale Aussage erforderte eine genauere Differenzierung der LGL-Infiltration bei unterschiedlicher ZTR und Virusinfektion in der postoperativen Phase unter Zuhilfenahme der unter B) beschriebenen Monitoring-Methoden.

Tabelle 9: LGL-Infiltration pro 100 Leukozyten im FNA und P.B. bei zellulärer Transplantatreaktion (ZTR) und Virusinfektion

FNA	LGL $\bar{x}$ 2,6 ($\pm$ 2,8) / 100 Leukos
-----	---

ZTR: n=184

P.B.	LGL $\bar{x}$ 0,5 ($\pm$ 0,6) / 100 Leukos
------	---

FNA	LGL $\bar{x}$ 7,4 ($\pm$ 5,4) / 100 Leukos
-----	---

VIRUS: n= 39

P.B.	LGL $\bar{x}$ 3,6 ($\pm$ 3,6) / 100 Leukos
------	---

1. LGL-Infiltration bei zellulärer Transplantatreaktion (ZTR)

Aus den Ergebnissen von 184 bewertbaren FNA wurden für diese Untersuchung die Werte der LGL, der Gesamt-Lympho-

zytenpopulation und der prozentualen LGL-Anteile an der Gesamtpopulation herangezogen. Die Zuordnung der LGL-Infiltration zu den entsprechenden Schweregraden der ZTR erfolgte innerhalb festgelegter C.I.-Intervalle (in 1,5 C.I.-Schritten).

1.1 LGL-Zahl unter Berücksichtigung der "Corrected
Increment" (C.I.)-Einteilung

a) im Feinnadelaspirat (FNA)

Mit zunehmendem Schweregrad der zellulären Infiltration im Transplantat - d.h. in höheren C.I.-Wertstufen - nimmt die Anzahl der LGL im FNA kontinuierlich von 0,5 bei AR 0 bis auf 5,7 bei AR III zu (Tab. 10). Gleichfalls steigt die Gesamtlymphozytenzahl (11,7 Ly bei AR 0 auf 54,9 bei C.I. 8) kontinuierlich an. In Relation zur Gesamtlymphozytenpopulation betragen die prozentualen LGL-Werte zwischen 4 % und 10,9 %.

b) im peripheren Blut

Die Wertverhältnisse in der zur FNA korrespondierenden Blutprobe (p.B.) unter gleichen Voraussetzungen spiegelt Tabelle 11 wider.

Die LGL-Zahlen betragen in allen C.I.-Wertstufen durchschnittlich zwischen 0,3 und 0,7. Die Lymphozyten-Zahlen liegen bei Werten von 7,0 bis 9,5 pro 100 Leukozyten. Entsprechend verhalten sich die Prozentzahlen der LGL in bezug zur Gesamtpopulation (durchschnittlich 2,8 und 7,1 Prozent).

Tabelle 10: Zuordnung der LGL, Gesamtlymphozyten (Ly ges.) und prozentualen Anteilswerte der LGL an der Gesamtlymphozytenpopulation (% LGL) im FNA zu festgelegten "Corrected Increment"-Intervallen. Standardabweichungen in Klammern angegeben.

C.I. Einteilung	Fallzahl n	LGL $\bar{x}/100$ Leuk.	Ly ges. $\bar{x}/100$ Leuk.	% LGL
0 - 1,4	49	0,5 ($\pm$ 0,8)	11,7 ($\pm$ 6,6)	4,9 % ($\pm$ 5,9)
1,5 - 2,9	28	1,2 ($\pm$ 1,1)	17,5 ($\pm$ 7,7)	7,6 % ($\pm$ 7,4)
3,0 - 4,4	20	1,7 ($\pm$ 1,4)	23,0 ($\pm$ 8,4)	6,9 % ($\pm$ 5,0)
4,5 - 5,9	25	3,1 ($\pm$ 2,1)	36,7 ($\pm$ 10,6)	8,9 % ($\pm$ 6,2)
6,0 - 7,9	27	4,2 ($\pm$ 2,1)	49,2 ($\pm$ 13,9)	9,2 % ($\pm$ 5,3)
> 8,0	35	5,7 ($\pm$ 3,4)	54,9 ($\pm$ 18,4)	10,9 % ($\pm$ 6,2)

Tabelle 11: Zuordnung der LGL-Zahlen, Gesamtlymphozytenzahlen (Ly ges.) und prozentualen Anteilswerte der LGL an der Gesamtlymphozytenpopulation (% LGL) im peripheren Blut zu "Corrected Increment"-Intervallen (SD in Klammern)

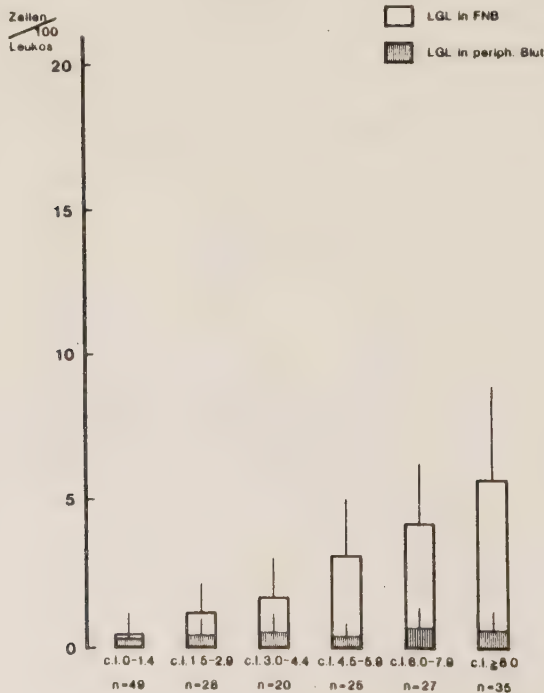
C.I. Einteilung	Fallzahl n	LGL $\bar{x}/100$ Leuk.	Ly ges. $\bar{x}/100$ Leuk.	% LGL
0 - 1,4	49	0,3 ($\pm$ 0,5)	9,0 ($\pm$ 5,7)	2,8 % ($\pm$ 4,2)
1,5 - 2,9	28	0,4 ($\pm$ 0,6)	9,5 ($\pm$ 5,8)	3,1 % ($\pm$ 4,3)
3,0 - 4,4	20	0,5 ($\pm$ 0,7)	7,0 ($\pm$ 4,1)	6,3 % ($\pm$ 9,0)
4,5 - 5,9	25	0,4 ($\pm$ 0,6)	9,5 ($\pm$ 4,4)	4,7 % ($\pm$ 8,2)
6,0 - 7,9	27	0,7 ($\pm$ 0,7)	8,7 ($\pm$ 5,3)	7,1 % ($\pm$ 7,6)
> 8,0	35	0,6 ($\pm$ 0,7)	8,0 ($\pm$ 5,1)	6,7 % ($\pm$ 9,7)

1.2 Gegenüberstellung der Ergebnisse aus FNA und P.B.

Die kombinierte Darstellung (Abb. 5) der Ergebnisse aus FNA und entsprechender peripherer Blutprobe gibt die unterschiedlichen Infiltrationswerte der LGL wieder. Während die LGL-Zahlen/100 Leukos in Relation zur zunehmenden zellulären Transplantatinfiltration kontinuierlich ansteigen, bleiben die Werte im P.B. innerhalb geringer Schwankungen ($\pm 0,2$) nahezu konstant.

Nach Abzug der Werte aus dem P.B. bleibt das "Increment" der LGL, d.h. die Differenz aus FNA und P.B. Es verkörpert die reine NK-Zell-Infiltration im Transplantat. Der jeweilige weiße Abschnitt der Säulen entspricht diesem Infiltrat.

Abb. 5: LGL-Zahl aus FNA und P.B. in Relation zu definierten C.I.-Intervallen



2. LGL-Infiltration bei Virusinfektion

Für die folgende Untersuchung standen Ergebnisse aus 39 bewertbaren FNA von Patienten mit serologisch nachgewiesenen Virusinfektionen zur Verfügung. Davon stammen 25 FNA von CMV-erkrankten Patienten, 4 von HSV-Erkrankten, 2 von einem an CMV und HSV gleichzeitig erkrankten Patienten und 8 von EBV-Fällen.

2.1 LGL-Zahl in Relation zur C.I.-Einteilung

a) im Feinnadelaspirat

Ein analoges Schema, wie unter 1,1, diente zur Auflistung der Ergebnisse aus den Feinnadelaspiraten unter Infektionsbedingungen (Tab. 12). Die Gesamtlymphozytenzahlen weisen in den chronologischen C.I.-Wertstufen eine annähernd konstante Zunahme auf (12,5 Ly/100 Leukos in AR 0 auf 61,4 für AR III). Bei fehlender oder nur geringfügiger ZTR wurden im Mittel zwischen 3,1 und 4,1 LGL/100 Leuk. registriert; innerhalb der C.I.-Stufen 3 - 6 wurden extrem hohe LGL-Zahlen von maximal 15,5 %, in der nächsthöheren Stufe durchschnittlich nur 7,3 % ausgezählt. Bei massiver ZTR erreichen die LGL-Werte wiederum einen hohen Mittelwert von 12,5 %.

Die in Relation zur Gesamt-Ly-Population errechneten LGL-Anteile weisen in allen 6 C.I.-Gruppen stark erhöhte Prozentzahlen auf. In den Aspiraten ohne zelluläre Infiltration bis zu den hohen Schweregraden der ZTR (C.I.>6) erreichen die prozentualen LGL-Anteile im Mittel Werte zwischen 17 % und 35 %.

Tabelle 12: Zuordnung der LGL-Zahlen, Gesamtlymphozyten und Prozentanteile an der Gesamtlymphozytenpopulation im FNA zu definierten "C.I."-Intervallen bei Virusinfektion (SD in Klammern)

C.I.	Fallzahl	LGL	Ly ges.	% LGL
Einteilung	n	$\bar{x}/100$ Leuk.	$\bar{x}/100$ Leuk.	
0 - 1,4	12	3,1	12,5	25,8 %
		($\pm$ 1,7)	($\pm$ 4,3)	($\pm$ 11,1)
1,5 - 2,9	8	4,1	24,4	18,0 %
		($\pm$ 2,1)	($\pm$ 8,1)	($\pm$ 9,2)
3,0 - 4,4	3	15,5	44,8	35,0 %
		($\pm$ 3,6)	($\pm$ 11,7)	($\pm$ 0,8)
4,5 - 5,9	8	10,6	41,1	26,1 %
		($\pm$ 4,5)	($\pm$ 7,3)	($\pm$ 11,4)
6,0 - 7,9	3	7,3	39,2	17,0 %
		($\pm$ 4,9)	($\pm$ 15,4)	($\pm$ 9,3)
> 8,0	5	12,5	61,4	21,0 %
		($\pm$ 4,4)	($\pm$ 17,3)	($\pm$ 6,4)

b) im peripheren Blut

Aus der Tabelle 13 lassen sich die aus dem peripheren Blut ermittelten Daten bei Virusinfektionen entnehmen. Beim Überblick über alle C.I.-Intervalle schwanken die durchschnittlichen Lymphozytenzahlen pro 100 Leukozyten zwischen 11,7 und 32,0. Die erhöhten LGL-Werte im P.B. betragen im Mittel zwischen 2,3, in der niedrigsten C.I.-Wertstufe bis maximal 10,3 in der C.I.-Gruppe 3,0 - 4,4. Auch im peripheren Blut wurden hohe LGL-Prozentsätze in bezug auf die Gesamt-Ly-Population ermittelt. Die Werte liegen zwischen 17 % und 33,7 %.

2.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse aus FNA und peripheren Blut bei Virusinfektion

Die im gleichen Maßstab wie unter 1.2 gezeichnete Darstellung (Abb. 5) macht die veränderten Zahlenverhältnisse der NK-Zellen bei Virusinfektion deutlich (Abb. 6). Neben den bereits stark erhöhten FNA-LGL-Werten in allen AR-Graden fallen die schraffierten Säulen der LGL-Werte aus dem P.B. auf. Das relativ geringe "absolute" in situ NK-Zell-Infiltrat (Differenz aus hohler und schraffierter Säule) in den beiden niedrigen ZTR-Gruppen nimmt anteilmäßig in den folgenden höheren ZTR-Schweregraden deutlich zu.

Tabelle 13: Zuordnung der LGL-Zahlen, Gesamtlymphozyten und Prozent-Anteile der LGL an der Gesamtlymphozytenpopulation im peripheren Blut zu definierten "C.I."-Intervallen bei Virusinfektion

C.I.	Fallzahl	LGL	Ly ges.	% LGL
Einteilung	n	$\bar{x}/100$ Leuk.	$\bar{x}/100$ Leuk.	
0 - 1,4	12	2,3	11,7	19,6 %
		($\pm$ 1,5)	($\pm$ 5,1)	($\pm$ 8,9)
1,5 - 2,9	8	3,6	19,1	16,9 %
		($\pm$ 3,2)	($\pm$ 10,5)	($\pm$ 6,9)
3,0 - 4,4	3	10,3	32,0	33,7 %
		($\pm$ 4,9)	($\pm$ 16,7)	($\pm$ 3,1)
4,5 - 5,9	8	4,3	15,4	24,6 %
		($\pm$ 3,9)	($\pm$ 9,4)	($\pm$ 9,9)
6,0 - 7,9	3	3,0	12,2	21,3 %
		($\pm$ 2,8)	($\pm$ 9,1)	($\pm$ 5,7)
> 8,0	5	2,4	14,2	17,0 %
		($\pm$ 1,5)	($\pm$ 7,5)	($\pm$ 8,9)

Abb. 5: LGL-Zahl bei ZTR aus FNA und P.B. in Relation zu definierten C.I.-Intervallen

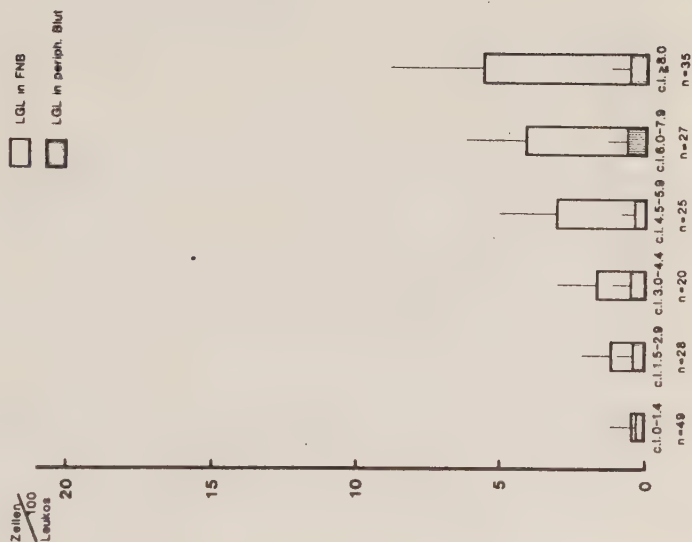
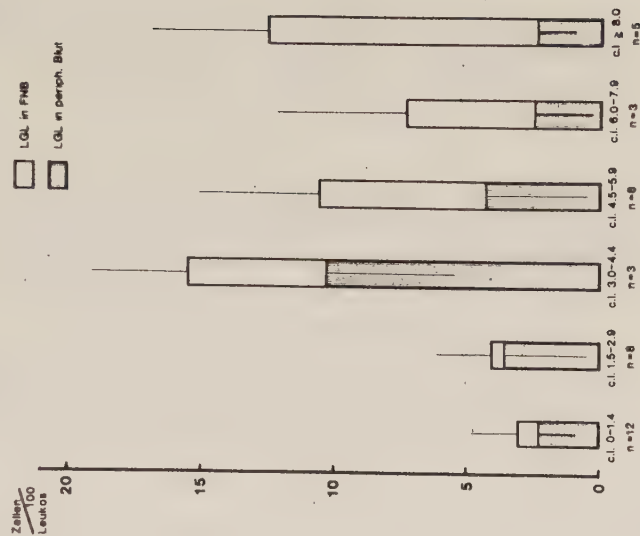


Abb. 6: LGL-Zahl bei Virusinfektion aus FNA und P.B. in Relation zu definierten C.I.-Intervallen



3. LGL-Infiltration im Vergleich ZTR und Virus- infektion

Die unter 1. und 2. gezeigten Ergebnisse veranlaßten zum direkten Vergleich der NK-Zell-Beteiligung bei Abstoßungsreaktion und Virusinfektion. Die ermittelten Werte aus FNA und P.B. wurden in zwei Gruppen unterteilt. Unter der Voraussetzung C.I. kleiner 3 erfolgte die Zuteilung zur Gruppe ohne ZTR (= AR 0 und AR 0-1). Alle Ergebnisse während inflammatorischer Transplantatreaktion, was einem C.I.-Wert von größer 3 entspricht, wurden unter die Rubrik ZTR eingeordnet.

3.1 Vergleich der LGL-Zahlen bei C.I. < 3 (keine ZTR)

77 repräsentative FNA erfüllten die Bedingung C.I. < 3 und dienten somit als Vergleichsgruppe für die postoperativ virusinfizierten Patienten. 20 bewertbare FNA stammen von Patienten, deren Serologie-Befunde zum Zeitpunkt der FNB-Entnahme signifikante Titeranstiege für CMV-, HSV- und EBV-Infektionen aufwiesen. In die Vergleichsstudie gehen analoge Durchschnittswerte der LGL und Gesamtlymphozyten aus FNA und P.B. ein (Tab. 14).

Bei AR 0 konnten im Mittel nur 0,8 % LGL gezählt werden, vergleichsweise dazu infiltrierte bei Virusinfektion durchschnittlich 3,5 LGL das Transplantat. Die Lymphozyten-Gesamtpopulation stieg von 13,5 % auf 17,3 %. Das eigentliche NK-Zell-Infiltrat im Transplantat wird durch den anteiligen Zuwachs der LGL an der Gesamtpopulation von 5,4 % auf 22,7 % verdeutlicht.

Tabelle 14: LGL- und Gesamtlymphozyten-Zahlen sowie LGL-Prozentsätze in FNA und P.B. während keiner Abstoßungsreaktion (C.I. < 3) angegeben in Mittelwerten bei Virusinfektion und Vergleichsgruppe ohne Infektion

Zellen / 100 Leukos		KEINE ZTR c.I.<3	
		n = 77	n = 20 Virusinfektion*
FNA	LGL	0,8 ± 0,9	3,5 ± 1,9
	Ly _{gesamt}	13,5 ± 7,5	17,3 ± 8,4
	$\frac{\text{LGL}}{\text{Ly}_g} \times 100$	5,4 % ± 6,7	22,7 % ± 11,0
P.B.	LGL	0,4 ± 0,5	2,8 ± 2,4
	Ly _{gesamt}	9,2 ± 5,8	13,9 ± 8,5
	$\frac{\text{LGL}}{\text{Ly}_g} \times 100$	3,0 % ± 4,2	19,3 % ± 7,9

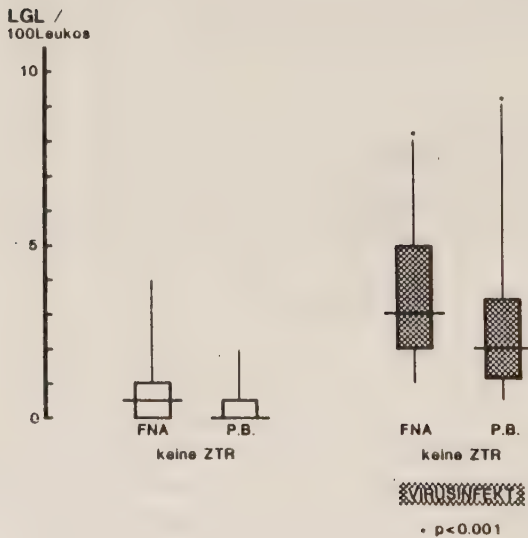
*) CMV-, HSV-, EBV-Infektion

Im peripheren Blut stiegen bei Virusinfektion LGL auf durchschnittlich 2,8 % (ausgehend von Bezugswert 0,4 %). Der NK-Zell-Anteil in der Lymphozytenpopulation ist im Mittel um mehr als das 6fache angestiegen; eine 3 %ige LGL-Beteiligung an der Ly-Population erhöht sich unter Virusinfektions-Bedingungen auf 19,3 %.

Die graphische Darstellung (Abb. 7) veranschaulicht den Zuwachs an LGL im Transplantat während Virusinfektion trotz keinerlei abstoßungsbedingter Infiltration. Gleichzeitig sind LGL im Blut deutlich angestiegen. Die

Mediane bzw. die Häufigkeitsverteilung der LGL-Population bei CMV-, HSV- und EBV-Infektion unterscheiden sich sowohl im FNA als auch im P.B. signifikant ($p < 0.001$)* von der Vergleichsgruppe ohne Infektion.

Abb. 7: LGL-Infiltration pro 100 Leukos in FNA und P.B. bei Virusinfekt (schraffierte Säulen, $n = 20$) und Vergleichsgruppe ohne Infekt (offene Säulen, $n = 77$) unter der Voraussetzung $C.I < 3$



* nach Mann-Whitney, Test zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben

3.2 Vergleich der LGL-Infiltration innerhalb der "Virusgruppen"

Unter der Voraussetzung, daß zum Zeitpunkt der Probeentnahme keine zelluläre Abstoßungsreaktion im Transplantat ablief, konnten die Werte von 12 CMV-, 2 HSV- und 5 EBV-Infektionen sowie von einer gleichzeitigen CMV- und HSV-Erkrankung verglichen werden.

Als Referenzgruppe dienten 77 Fälle ohne Virusinfektion (Tab. 15).

Die CMV-Infektion war in diesem Patientenkollektiv mit 60 % am häufigsten vertreten. Die Werte aus dieser Gruppe entsprechen nahezu den durchschnittlichen Zellzahlen der gesamten Virus-Daten.

Die LGL-Zahlen der HSV- und CMV + HSV-Gruppe übersteigen die entsprechenden Vergleichswerte im Aspirat. In Abhängigkeit von geringeren Gesamtlymphozytenzahlen ergeben sich höhere LGL-Prozentsätze (von 34 % und 33 %).

Im Vergleich dazu ist bei EBV-Infektion sowohl eine deutlich geringere LGL-Infiltration als auch niedrigere Lymphozytenzahl im FNA und P.B. zu verzeichnen.

Tabelle 15: Vergleich der LGL- und Gesamt-Ly-Zahlen sowie LGL-Prozentsätze in FNA und P.B. bei CMV-, HSV und EBV-Infektion (C.I. < 3)

KEINE ZTR: c.i. < 3		kein Virusinfekt	CMV Infektion	HSV Infektion	CMV+HSV Infektion	EBV Infektion
Zellen / 100Leuk		n = 77	n = 12	n = 2	n = 1	n = 5
FNA	LGL	0,8 ± 0,9	3,8 ± 2,3	4,0 ± 0,0	5,0	2,3 ± 0,6
	Ly _g	13,5 ± 7,5	18,9 ± 10,0	12,0 ± 1,5	15,0	15,9 ± 4,8
	$\frac{\text{LGL}}{\text{Ly}_g} \times 100$	5,4% ± 6,7	22,3% ± 10,4	34,0% ± 4,0	33,0%	17,0% ± 10,7
P.B.	LGL	0,4 ± 0,5	3,5 ± 2,8	2,5 ± 0,0	2,0	1,3 ± 0,5
	Ly _g	9,2 ± 5,8	15,8 ± 9,9	13,8 ± 6,3	14,0	10,5 ± 3,2
	$\frac{\text{LGL}}{\text{Ly}_g} \times 100$	3,0% ± 4,2	21,3% ± 7,1	23,0% ± 10,0	14,0%	14,1% ± 6,7

3.3 Vergleich der LGL-Zahlen bei C.I. ≥ 3 (ZTR)

Zur Untersuchung von virusbedingter NK-Zell-Infiltration und NK-Zell-Beteiligung bei inflammatorischer Transplantatinfiltration wurden 19 FNA von Patienten mit serologisch nachgewiesenen Virusinfektionen mit 107 FNA ohne Infektion unter der Bedingung C.I. ≥ 3 verglichen (Tab. 16).

Tabelle 16: LGL- und Gesamt-Ly-Zahl in FNA und P.B. unter ZTR-Bedingungen C.I. ≥ 3 , angegeben in Mittelwerten bei VI und Vergleichsgruppe ohne Infektion

Zellen / 100 Leukos		ZTR c.i. ≥ 3	
		n 107	n 19 Virusinfektion *
FNA	LGL	3,9 $\pm$ 2,9	11,4 $\pm$ 5,0
	Ly _{gesamt}	43,3 $\pm$ 18,4	46,9 $\pm$ 15,4
	$\frac{\text{LGL}}{\text{Ly}_g} \times 100$	9,2% $\pm$ 5,9	24,7% $\pm$ 10,5
P.B.	LGL	0,6 $\pm$ 0,6	4,7 $\pm$ 4,2
	Ly _{gesamt}	8,3 $\pm$ 4,9	20,1 $\pm$ 14,4
	$\frac{\text{LGL}}{\text{Ly}_g} \times 100$	6,4% $\pm$ 8,9	25,1% $\pm$ 9,7

*) CMV-, HSV-, EBV-Infektion

In der Referenzgruppe ohne Infekt infiltrierten inflammationsbedingt durchschnittlich 43.3 Lymphozyten und davon 3,9 LGL pro 100 Leukos das Transplantat; das ergibt rechnerisch einen 9,2 %igen LGL-Anteil an der Gesamtlymphozyten-Population. Im P.B. bleiben die Zahlenverhältnisse nahezu unverändert (LGL $\bar{x}$ 0,6, Ly $\bar{x}$ 8,3 und 6,4 % LGL).

Gravierende Veränderungen zeigen die "Virus"-Ergebnisse. Aus einer 3fachen LGL-Erhöhung (auf $\bar{x}$ 11,4) bei annähernd gleichhoher Ly-Infiltration im Aspirat ($\bar{x}$ 46,9) errechnet sich eine 24,7 %ige NK-Zell-Beteiligung an der

inflammatorisch-lymphozytären ZTR unter Infektionsbedingungen.

Analog dazu konnten auch im peripheren Blut diskrepante Werte ermittelt werden. Aus einer durchschnittlich 7,8-fachen LGL-Zunahme (auf $\bar{x}$ 4,7/100 Leukos) resultiert bei einer Lymphozytose von 20,1 Zellen/100 Leukos ebenfalls ein 25 %iger NK-Zell-Prozentsatz an der Gesamt-Ly-Population im Blut.

Die Grafik (Abb. 8) verdeutlicht die unterschiedlichen Zellverteilungen der LGL pro 100 Leukozyten unter Abstoßungsbedingung und gleichzeitiger Virusinfektion. Sowohl im FNA als auch im P.B. konnten virusbedingt eine signifikant erhöhte LGL-Infiltration nachgewiesen werden ($p < 0,001$, nach Mann-Whitney-Test).

Bei differenzierterer Aufschlüsselung der ZTR-Einteilung (ZTR I gegen ZTR II/III) im Vergleich mit den entsprechenden CMV-Infektions-Zellbefunden aus 13 FNA zeigten sich keine bemerkenswerten Unterschiede (Tab. 17 und Tab. 18).

Aufgrund der durchschnittlich höheren Ly-Infiltration ($\bar{x}$ 52,6) im Transplantat bei massiver zellulärer Abstoßung kann der niedrigere LGL-Prozentsatz von 20,7 % verglichen mit 27,3 % bei ZTR I in der Virusgruppe erklärt werden. Die LGL-Zunahme gegenüber der Kontrolle ist in beiden Kollektiven nahezu identisch. Im P.B. bleibt der NK-Zell-Prozentsatz trotz unterschiedlich hoher Lymphozytose konstant (23,3 % und 24 %).

Abb. 8: LGL-Infiltration (pro 100 Leukos) in FNA und P.B. bei VI. (schraffierte Säulen, $n = 19$) und Vergleichsgruppe ohne Infekt (offene Säulen, $n = 107$) während ZTR (C.I. ≥ 3).

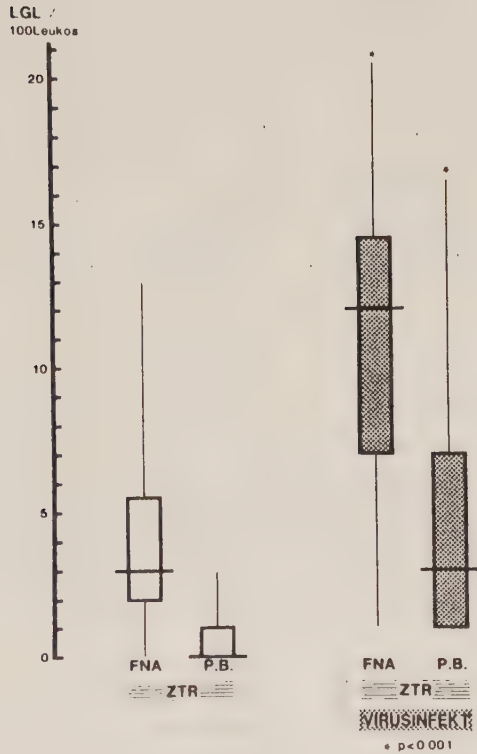


Tabelle 17: LGL- und Lymphozyten-Zahlen bei ZTR Grad I und CMV-Infektion

Zellen / 100 Leukos		ZTR: $3 \leq \text{c.l.} < 6$	ZTR: $3 \leq \text{c.l.} < 6$
		n= 45	n= 6 CMV-Infektion
FNA	LGL	2,5 $\pm$ 1,9	12,3 $\pm$ 4,6
	Ly _{gesamt}	30,6 $\pm$ 11,8	46,1 $\pm$ 9,9
	$\frac{\text{LGL}}{\text{Ly}_g} \times 100$	8,0% $\pm$ 5,8	27,3% $\pm$ 9,3
P.B.	LGL	0,4 $\pm$ 0,6	6,3 $\pm$ 5,5
	Ly _{gesamt}	8,4 $\pm$ 4,4	23,3 $\pm$ 15,8
	$\frac{\text{LGL}}{\text{Ly}_g} \times 100$	5,4% $\pm$ 8,5	23,3% $\pm$ 9,1

Tabelle 18: LGL- und Lymphozyten-Zahlen bei ZTR Grad II und III und bei CMV-Infektion

Zellen / 100 Leukos		ZTR: $\text{c.l.} \geq 6$	ZTR: $\text{c.l.} \geq 6$
		n= 62	n= 7 CMV-Infektion
FNA	LGL	5,0 $\pm$ 3,0	11,2 $\pm$ 5,3
	Ly _{gesamt}	52,4 $\pm$ 16,8	52,6 $\pm$ 21,1
	$\frac{\text{LGL}}{\text{Ly}_g} \times 100$	10,2% $\pm$ 5,9	20,7% $\pm$ 7,7
P.B.	LGL	0,6 $\pm$ 0,7	3,4 $\pm$ 1,9
	Ly _{gesamt}	8,3 $\pm$ 5,2	14,6 $\pm$ 8,1
	$\frac{\text{LGL}}{\text{Ly}_g} \times 100$	6,9% $\pm$ 8,3	24,0% $\pm$ 8,7

3.4 Vergleich der LGL-Infiltration innerhalb der ZTR- "Virus"-Gruppen

Eine Gegenüberstellung der Daten aus Virusinfektions-Fällen bei gleichzeitiger zellulärer Infiltration im Transplantat zeigt Tabelle 19. Die Ergebnisse aus 13 FNA bei CMV-Infektion entsprechen nahezu den unter 3.3 gezeigten gesamten "Virus"-Daten. Vergleichsweise höher fielen wieder die Werte der HSV-Gruppe aus. Ein massiver LGL-Zuwachs ($\bar{x}$ 17,0) im Transplantat ergab trotz hoher Lymphozytose einen 40,5 %igen NK-Zell-Anteil innerhalb der Zellpopulation; entsprechend resultierte im P.B. ein LGL-Prozentsatz von 36,5 %. Die einmalig dokumentierten Werte eines Patienten mit gleichzeitiger CMV- und HSV-Infektion sind ebenfalls aufgelistet.

Tabelle 19: Vergleich der Zell-Infiltrationen in FNA und P.B. bei CMV-, HSV- und EBV-Infektion (C.I. ≥ 3)

ZTR c.I. ≥ 3		kein Virusinfekt	CMV Infektion	HSV Infektion	CMV-HSV Infektion	EBV Infektion
Zellen / 100Leuk		n=107	n=13	n=2	n=1	n=3
FNA	LGL	3,9 $\pm$ 2,9	11,7 $\pm$ 4,9	17,0 $\pm$ 1,0	12,0	6,0 $\pm$ 0,8
	Ly _g	43,3 $\pm$ 18,4	49,6 $\pm$ 17,2	42,5 $\pm$ 2,5	33,5	42,5 $\pm$ 9,8
	$\frac{\text{LGL}}{\text{Ly}_g} \times 100$	9,2% $\pm$ 5,9	23,8% $\pm$ 9,1	40,5% $\pm$ 4,5	36,0%	14,7% $\pm$ 2,9
P.B.	LGL	0,6 $\pm$ 0,7	4,7 $\pm$ 4,2	10,3 $\pm$ 1,8	4,5	1,3 $\pm$ 0,5
	Ly _g	8,3 $\pm$ 4,9	18,6 $\pm$ 13,0	27,8 $\pm$ 2,3	12,0	24,0 $\pm$ 21,9
	$\frac{\text{LGL}}{\text{Ly}_g} \times 100$	6,4% $\pm$ 8,9	23,7% $\pm$ 8,9	36,5% $\pm$ 3,5	38,0%	19,0% $\pm$ 7,8

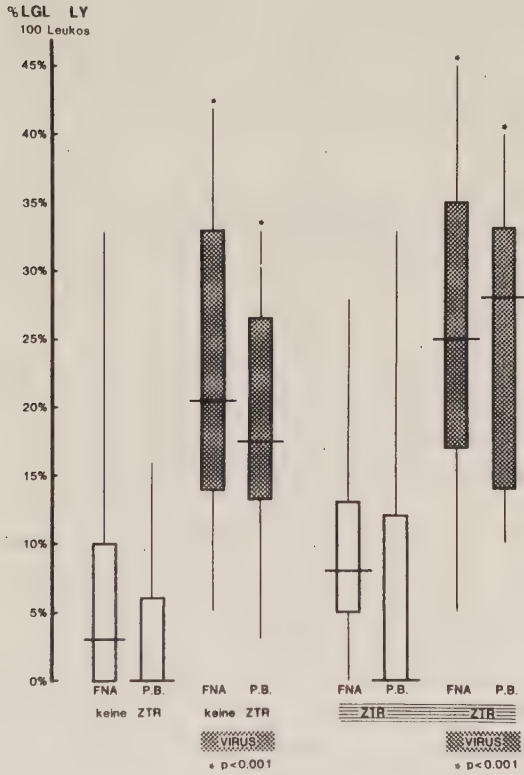
Auffällig niedrige LGL-Zahlen bei jedoch gleichhoher Lymphozytose in FNA ($\bar{x}$ Ly 42,5) und P.B. ($\bar{x}$ Ly 24) sind bei Patienten mit Epstein-Barr-Virusinfektion zu verzeichnen. Bei durchschnittlich 6 LGL/100 Leukos im Aspirat resp. 1,3 im Blut errechnete sich ein geringerer NK-Zell-Prozentsatz von 14,7 % im FNA resp. 19 % im Blut.

3.5 LGL-Prozentsatz im Vergleich ZTR und VI

Die Grafik (Abb. 9) veranschaulicht den virusbedingten Zuwachs des NK-Zell-Anteils an der Ly-Population unabhängig von der Höhe des zellulären Infiltrats. In beiden Vergleichsgruppen - mit und ohne zelluläre AR - konnte eine signifikante Zunahme des LGL-Prozentsatzes im Aspirat sowie gleichzeitig im P.B. nachgewiesen werden ($p < 0,001$; nach Mann-Whitney-Test).

In der Häufigkeitsverteilung liegen die Mediane der NK-Zell-Anteile im virusinfizierten Transplantat bei 20,5 % (keine ZTR) und 25 % (ZTR); analog im Blut bei 17,5 % (keine ZTR) und 28 % (ZTR). Vergleichsweise niedrig liegen die Mediane in den Gruppen ohne Infekt (3 % und 8 % im FNA gegenüber 0 % im P.B.).

Abb. 9: LGL-Prozentsätze aus FNA und P.B. mit und ohne ZTR verglichen mit prozentualer NK-Zell-Beteiligung während VI



3.6 Korrelation de LGL-Zahlen mit immunologischen Monitoring

Im Rahmen des immunologischen Monitorings wurden am Tag der Feinnadelbiopsie die Lymphozyten-Subpopulation im peripheren Blut mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern bestimmt. Die T 4-positiven Helfer-Zellen und T 8-positiven Zellen (Suppressor/Killer-Zellen) wurden registriert und ihr Verhältnis zueinander bestimmt.

Bei Normalpersonen liegt das T 4/T 8-Verhältnis zwischen 1 und 2. Die Umkehr der 4/8-Ratio gilt als virus-spezifischer Indikator innerhalb der Lymphozyten-Subpopulation.

Tabelle 20 zeigt eine Gegenüberstellung der Zellverhältnisse bei serologisch nachgewiesener CMV-Infektion abhängig von der Transplantatreaktion in Relation zum immunologischen Parameter (T 4/8 Ratio < 1 bzw. > 1).

In den 12 Fällen mit AR 0 konnte kein Unterschied in bezug auf die LGL-Population zwischen den Vergleichsgruppen mit und ohne Umkehr ermittelt werden.

Zum Vergleich der Gruppen mit inflammatorischer ZTR konnten den 11 Fällen mit Übereinstimmung des serologisch und immunologisch positiven Virusbefundes nur 2 Fälle ohne 4/8 Umkehr gegenübergestellt werden. Dabei wurden relativ niedrige LGL- und Gesamtlymphozyten-Zahlen in der Gruppe mit immunologisch unauffälligen Ly-Subpopulationen (keine Umkehr) registriert. Der LGL-Prozentsatz blieb in der Vergleichsnorm.

Tabelle 20: LGL. Ly gesamt und LGL in % bei CMV-Infektion, korreliert mit Ly-Subpopulationsverhältnis (T 4/8)

CMV-Infektion: (c.l.<3)		4/8 RATIO <1 n=7	4/8 RATIO >1 n=5
FNA	LGL	4,4 ± 2,5	3,1 ± 1,7
	Ly _g	21,8 ± 11,6	14,8 ± 4,9
	%LGL	23,4% ± 11,2	20,6% ± 9,1
P.B.	LGL	4,6 ± 3,2	2,0 ± 1,0
	Ly _g	19,6 ± 11,4	9,3 ± 2,3
	%LGL	22,0% ± 7,1	20,2% ± 6,9

CMV-Infektion: ZTR (c.l.≥3)		4/8 RATIO <1 n=11	4/8 RATIO >1 n=2
FNA	LGL	12,4 ± 4,2	7,8 ± 6,8
	Ly _g	51,8 ± 17,0	37,5 ± 12,5
	%LGL	25,1% ± 7,6	16,5% ± 12,5
P.B.	LGL	5,1 ± 4,5	2,5 ± 1,5
	Ly _g	20,4 ± 13,4	8,8 ± 1,8
	%LGL	20,3% ± 8,2	26,0% ± 12,0

4. LGL-Infiltration im mononukleären Konzentrat

Seit März 1983 wurde parallel zur FNA das mononukleäre Konzentrat aus der Blutprobe sowohl lichtmikroskopisch als auch fluoreszenz-immunologisch ausgewertet. Ab diesem Zeitpunkt gingen LGL- bzw. Gesamtlymphozytenwerte aus 117 bewertbaren Konzentraten (M.K.) in die Studie ein, wobei analog zum M.K. eine repräsentative FNB zur Verfügung stand.

4.1 LGL-Zahlen bei unterschiedlichen Inflammations- graden

LGL- bzw. Lymphozyten-Verteilung im M.K. in Relation zu den im dazugehörigen FNA ermittelten ZTR-Graden zeigt Tabelle 21.

Tabelle 21: LGL- und Ly-Zahlen im M.K. in Relation zu ZTR aus FNA

Mononukleäres Konzentrat			
Zellen / 100 Leukos	Inflam. c.l.<3	Inflam. 3<c.l.<6	Inflam.>6
	n = 74	n = 30	n = 13
LGL	1,7 ± 1,6	1,7 ± 1,7	2,4 ± 2,7
Ly gesamt	48,7 ± 14,5	42,9 ± 15,6	48,5 ± 12,0
$\frac{\text{LGL}}{\text{Ly g}} \times 100$	3,6 % ± 3,5	4,0 % ± 4,0	4,7 % ± 5,2

Die LGL-Zahlen/100 Leukos und deren prozentualer Anteil an der Gesamt-Ly-Population unterscheiden sich innerhalb der definierten Gruppen ($C.I. < 3$; $3 \leq C.I. \leq 6$; $C.I. > 6$) nur geringfügig. Im Mittel erscheinen 2 LGL/100 Leukozyten im M.K. aus Blut von immunsupprimierten Patienten. Bei einer gleichhohen Lymphozytose in allen drei Gruppen errechnet sich ein LGL-Prozentsatz von 4 %. Somit entsprechen die NK-Zell-Werte im M.K. den Ergebnissen aus der zur FNA-Bewertung herangezogenen P.B.-Probe.

4.2 Vergleich zwischen Protozoen-Infektion und Virus-Infektion

Die Auswahl der Vergleichsgruppen Virusinfektion und Protozoen-Infektion wurde aufgrund differential-diagnostischer Kriterien getroffen. Pneumozystis-carinii-Infektionen treten bei immunsupprimierten Patienten als schwer therapierbare Pneumonien in Erscheinung und imitieren das klinische Bild einer Virusinfektion.

Pneumozystis-Erreger können im Trachealsekret oder mittels Lungenbiopsie durch Anzüchtung und Spezialfärbung oder durch spezifische Antikörper ab der 2. Woche durch KBR im Serum nachgewiesen werden.

3 bewertbare M.K. stammen von zwei an Pneumozystis carinii erkrankten Patienten. Die Daten der Kontrollgruppen rekrutieren sich aus 32 mononukleären Konzentraten von Patienten

- die keine ZTR im FNA zum Zeitpunkt der Blutentnahme aufwiesen (bzw. keine Abstoßungstherapie erhielten) und

- in deren Blut während des ganzen postoperativen Beobachtungszeitraums niemals eine Virusinfektion serologisch nachgewiesen werden konnte bzw. auch kein klinischer Infektions-Verdacht bestand.

Die Werte von 6 an CMV erkrankten Patienten gehen anhand von 14 M.K. in die Virus-Gruppen ein. Aus den CMV-Titer-Bestimmungen konnten 10 Fälle als Primärinfektionen eingestuft werden (Tab. 22).

Tabelle 22: LGL, Ly gesamt und NK-Zell-Prozentsatz bei CMV-Infektion, Protozoen-Infektion und Vergleichsgruppe ohne Infektion. Analog dazu fluoreszenzmikroskopische M.K.-Befunde der Ly-Subpopulationen und deren T 4/8 Verhältnis

Zellen/ 100 Leukos	kein Infekt	parasit. Infekt	CMV- Infekt		
	n=32	n=3	n=14	n=10 prim.	n=4 Re
LGL	1.3 ± 1.4	0.5 ± 0.7	6.7 ± 2.8	7.6 ± 2.8	4.6 ± 0.9
Ly gesamt	53.6 ± 18.4	51.3 ± 20.3	69.7 ± 12.8	74.6 ± 11.9	57.6 ± 4.1
$\frac{LGL}{Ly g} \times 100$	3.0% ± 3.6	2.3% ± 3.2	9.9% ± 4.1	10.6% ± 4.6	8.3% ± 1.3
OKT 4	36.3 ± 9.6	36.6 ± 6.3	20.4 ± 7.4		
OKT 8	24.3 ± 9.3	31.7 ± 10.6	42.9 ± 9.7		
Ratio $\frac{4}{8}$	1.58 ± 0.5	1.23 ± 0.3	0.49 ± 0.2	0.47 ± 0.2	0.54 ± 0.1

Die Fälle mit Pneumozystis-Infektion unterscheiden sich von der Kontrollgruppe ohne Infektion weder durch die LGL-Zahlen ($\bar{x}$ 1,3 und 0,5/100 Leukos) noch durch die Gesamtymphozyten-Zahlen ($\bar{x}$ 53,6 und 51,3/100 Leukos),

noch durch die davon abhängigen prozentualen LGL-Anteile (3 bzw. 2,3 %) in signifikanter Weise ($p < 0,7$).

Im Gegensatz dazu zeigen die 14 CMV-Fälle einen signifikanten ($p < 0.001$)* Unterschied in den LGL-Zahlen. Ausgehend vom Kontrollwert $\bar{x}$ 1,3 LGL/100 Leukos steigen die NK-Zellen bei Virusinfektion um das 5fache auf $\bar{x}$ 6,7 im M.K. an. Trotz vergleichsweise stärkerer Lymphozytose von $\bar{x}$ 69,7 Ly/100 Leukos kann ein auf 10 % erhöhter NK-Zell-Anteil innerhalb der Ly-Population errechnet werden.

Bei CMV-Primärinfektion resultiert aus massiver lymphozytärer Infiltration ($\bar{x}$ 74,6 Ly/100 Leukos) und durchschnittlich 7,6 LGL ein NK-Zell-Prozentsatz von 10,6 %. Die Werte für die Reinfektion fallen dagegen niedriger, jedoch nicht signifikant verschieden ($p < 0.25$)* aus ($\bar{x}$ 4,6 LGL, $\bar{x}$ 57,6 Ly/100 Leukos und 8,3 % an NK-Zellen).

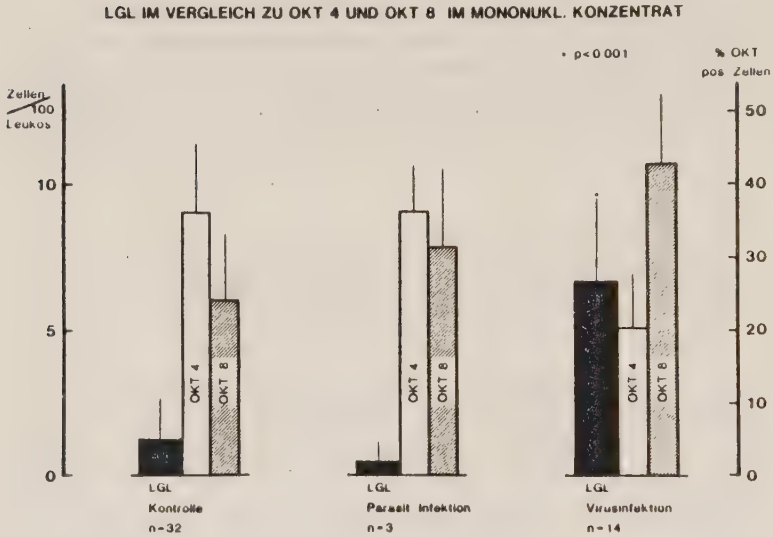
Auch die T-Zell-Subpopulationen weisen virusspezifische Veränderungen auf. Im Gegensatz zur Protozoen-Infektion und zur Kontrollgruppe ohne Infektion ergeben die T 4- und T 8-Werte eine signifikante Umkehr ihres 4/8-Verhältnisses von 1,58 bzw. 1,23 auf 0,49 bei CMV-Infektion ($p < 0.001$)*.

4.3 Korrelation der LGL-Zahlen mit immunologischem Virus-Monitoring

Die virusbedingte Umverteilung der T-Helper und -Suppressor Subpopulationen steht in Relation zur signifikant 5fach erhöhten LGL-Infiltration im M.K. (Abb. 10).

* χ^2 -Test

Abb. 10: LGL-Infiltration (schwarze Säulen) und T-Zell-Subpopulationen (T 4 weiße, T 8 schraffierte Säulen) im M.K. in drei Vergleichsgruppen



Die gemittelten Einzelwerte der LGL und T 4/T 8-positiven Zellen können der Tabelle 22 entnommen werden.

Die T 4-positiven Zellen verzeichnen bei CMV-Infektion einen Abfall von durchschnittlich 36,3 % bzw. 36,6 % auf 20,4 % positiv-fluoreszierende Zellen.

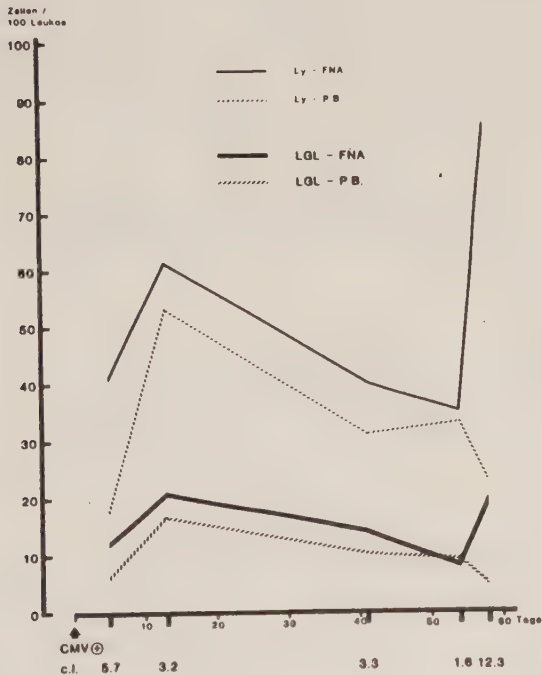
Gemäß der virusspezifisch hohen T 8-Infiltration ($\bar{x}$ 42,9) ergibt sich aus dieser Konstellation die Umkehr der 4/8-Ratio.

Bei Virusinfektion proliferieren somit sowohl NK-Zellen als auch T-Killer/Suppressor-Zellen im Blut.

5. Patientenverläufe

In einem Zeitraum von 58 Tagen wurden die LGL-Zahlen und Gesamt-Ly-Zahlen aus 5 bewertbaren FNA bzw. P.B.-Proben eines Patienten mit CMV-Infektion im chronologischen Verlauf erfaßt (Abb. 11). Vor dem pathologischen Virus-Titer-Anstieg standen keine repräsentativen Aspi-rate zur Verfügung.

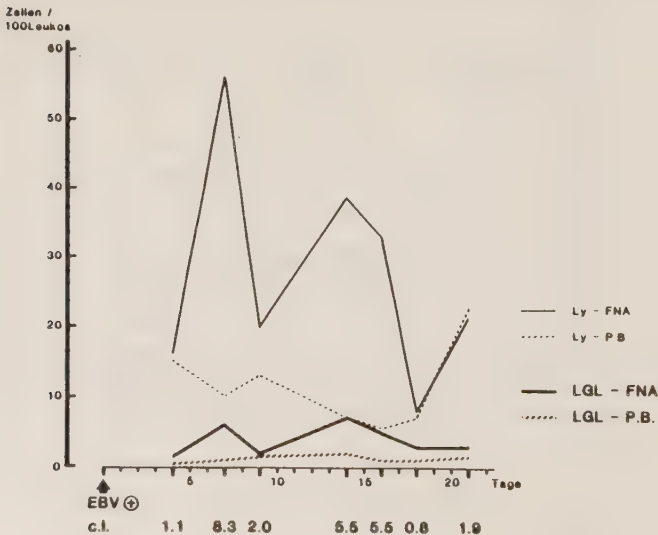
Abb. 11: Patientenverlauf einer CMV-Infektion (Pat. B.)



Am 5. Tag nach dem positiven CMV-Befund trat bereits eine massive LGL-Infiltration im Transplantat sowie auch im P.B. auf. Der im Monitoring erfaßte Maximalwert wurde am 13. Tag nach 4fachem Titeranstieg erreicht, um dann kontinuierlich bis zum 41. bzw. 54. Tag abzufallen. Eine interessante Konstellation entstand während der massiven ZTR am 58. Tag (C.I. = 12,3). Bei extremer Lymphozytose im Transplantat mit 20 %iger NK-Zell-Be teiligung fielen die LGL-Zahlen im Blut dagegen weiter ab.

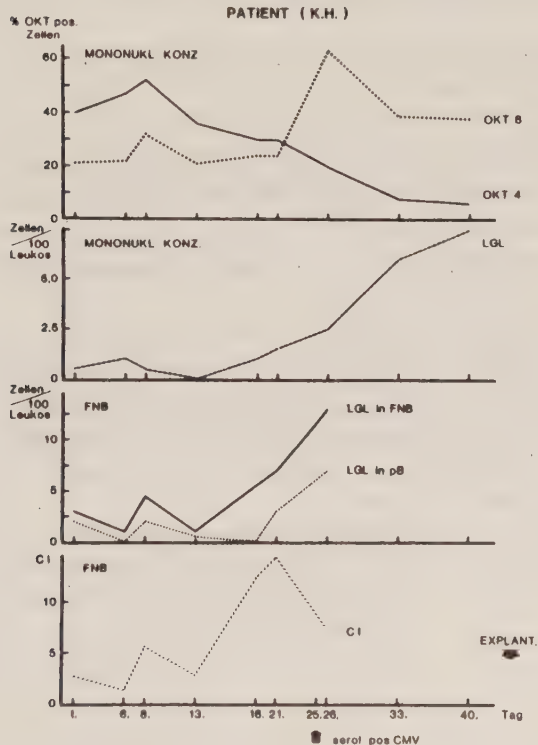
Der 23tägige Beobachtungszeitraum einer Epstein-Barr-Virusinfektion (Abb. 12) begann am 4. Tag nach dem pa-thologischen VCA-IgM-Titer-Befund. Während die Ly-Popu-lation im Aspirat größeren Schwankungen im Vergleich zum CMV-Verlauf unterlag, konnten bei einem relativ niedrigen LGL-Infiltrationsniveau nur zwei Peak-Werte im FNA am 7. und 14. Tag erfaßt werden. Die LGL-Werte im Blut blieben konstant niedrig.

Abb. 12: Patientenverlauf einer EBV-Infektion (Pat. Wl.)
(gleicher Maßstab für Zellzahl/100 Leukos!)



Das gesamte Monitoring - Programm nach Nierentransplantation zur Erfassung von ZTR und Virusinfektion ist in zeitlich parallelen Kurvenverläufen dargestellt (Abb.13). Die Daten eines 33jährigen Patienten konnten 18 Tage nach Transplantation über den Zeitraum von 40 Tagen dokumentiert werden.

Abb. 13: Monitoring eines Transplantationspatienten (Pat. H.) vom 18. bis 58. postoperativen Tag. Die erste Grafik zeigt Ly-Subpopulations-Verlauf im M.K. (T 4 und T 8-positive Zellen). Die beiden mittleren Kurvenverläufe repräsentieren die LGL-Infiltration im FNA, P.B. und M.K. Die letzte Grafik gibt den analogen "C.I."-Verlauf an.



In dieser Zeitspanne wurden am 8. und 21. Tag durch die Ermittlung des "Corrected Increment" (C.I. 5,6 und 14,4) inflammatorische Transplantatreaktionen diagnostiziert.

Während der serologische Nachweis einer Cytomegalie-Infektion erst am 25. Tag gelang, wiesen die Monitoring-Ergebnisse schon früher auffällige Veränderungen auf:

- T 4/8-Umkehr auf 0,32 um den 22. Tag; 5 Tage davor lag die 4/8-Ratio noch bei 1,25
- kontinuierlicher LGL-Anstieg im M.K. um den 20. Tag bis zum Ende des Beobachtungszeitraums
- LGL-Anstieg im Aspirat um den 19. Tag
- LGL-Anstieg im peripheren Blut um den 20. Tag

Ab dem 26. Tag standen keine weiteren bewertbaren FNB zur Verfügung.

Am 47. Tag erfolgte die Explantation. Der Histologie-Befund ergab die Diagnose einer chronisch obliterierenden und nekrotischen Transplantatvaskulopathie mit Parenchymnekrose und sekundärer Thrombosierung.

Bei vergleichender Kurvenbetrachtung zeigt sich interessanterweise das gleichzeitige Vorkommen einer massiven, klinisch relevanten ZTR im Transplantat und virusspezifischer Veränderungen durch NK-Zell-Infiltration im FNA, P.B. und M.K., sowie durch eine 4/8-Umkehr in der T-Zell-Subpopulation.

6. Zeitliche Korrelation zwischen serologischem Befund,
T 4/8-Umkehr und LGL-Anstieg bei Virusinfektion

Die Zeitabstände vor und nach dem Zeitpunkt des pathologischen (CMV/ bzw. CMV + HSV) Titer-Anstiegs in Relation zu den im Monitoring erfaßten Parametern, wie 4/8-Umkehr und mehrfacher LGL-Anstieg sind in der Tabelle 23 dokumentiert.

Bei dem grenzwertig positiven CMV-IgM-Titeranstieg von 1:40 bei fünf Patienten stieg die KBR innerhalb von 2 Monaten auf das 4fache des Ausgangstiters an.

In 4 von 6 Fällen war bereits zwischen 1 und 5 Tagen vor dem serologischen CMV-Nachweis eine 4/8-Umkehr, ein LGL-Anstieg und die klinische Virussyptomatik zu verzeichnen.

In einem Fall deutete nur eine LGL-Erhöhung 2 Tage zu-
vor auf einen Virusinfekt hin. In einem anderen Fall konnten ein LGL-Anstieg und die klinische Symptomatik, jedoch keine 4/8-Umkehr vermerkt werden.

Eine 100 %ige Korrelation lassen die am gleichen Tag erhobenen Daten in 2 Fällen zu.

3 von 6 Fällen ergaben eine 100 %ige Übereinstimmung der Vergleichsparameter in den Tagen 1 bis 20 nach dem positiven Virus-Befund. Die restlichen Fälle wiesen unterschiedliche Übereinstimmungen hinsichtlich 4/8-Umkehr und LGL-Anstieg auf und können der Tabelle entnommen werden.

Die Werte eines Patienten mit gleichzeitiger CMV und HSV-Infektion gingen nicht in die Studie ein, da außer einer bewertbaren FNB 25 Tage vor Virusnachweis keine weiteren Daten zur Verfügung standen.

Tabelle 23: Dokumentation des Zeitabstandes vor bzw. nach dem Nachweis des pathologischen Titeranstiegs und der virusspezifischen Parameter ermittelt aus klinischer Symptomatik, T 4/8-Umkehr und LGL-Anstieg aus FNA und P.B.

Pa- tient	VI-Typ	Zeitabstand	Titer	Klinik	4/8- Umkehr	LGL
P.B.	CMV-PRIM	6 Tage nach	IgM 1:160	+	+	++
P.G.	CMV-PRIM	2 Tage nach	IgM 1:160	+-	+	-
P.Sch.	CMV-PRIM	am gleichen Tag	IgM 1:160	+	+	+
P.P.	CVM-PRIM	1 Tag <u>vor</u>	IgM 1:160	+	+	+
P.Pe.	CVM-PRIM	2 Tage <u>vor</u>	IgM 1:160	-	-	+
P.H.	CVM-PRIM	3 Tage <u>vor</u>	IgM 1:160	+	+	++
P.S.	CVM-RE	am gleichen Tag	IgM 1:160	+	+	+
P.W.	CVM-RE	20 Tage nach	IgM 1:160	+-	+	+
P.I.	CVM-RE	12 Tage nach	IgM 1: 40	+	+	+
P.Ha.	CVM-RE	4 Tage nach	IgM 1: 40	+	-	-
P.We.	CVM-RE	1 Tag nach	IgM 1: 40	+	-	+
P.Go.	CVM-PRIM	2 Tage <u>vor</u>	IgM 1: 40	+	+	+
P.M.	CVM-RE	5 Tage <u>vor</u>	IgM 1: 40	+	-	-
P.Ma. +	CVM-RE	1 Tag <u>vor</u>	IgM 1:160	+-	+	++
	HSV-RE	7 Tage nach	HSV 1:256			
P.HO. +	CMV-RE	25 Tage vor	KBR 1:128	-	-	-
	HSV-RE	dazwischen keine Daten	HSV 1:256			

Die Korrelations-Daten von Patienten mit HSV und EBV-Infektionen sind in Tabelle 24 zusammengestellt. Außer einer 100 %igen Übereinstimmung in einem Fall einer HSV-Infektion zeigten die übrigen Daten diverse Konstellationen.

Tabelle 24: Dokumentation des Zeitabstandes vor bzw. nach dem Nachweis des pathologischen Titeranstiegs und der virusspezifischen Parameter ermittelt aus klinischer Symptomatik, T 4/8-Umkehr und LGL-Anstieg aus FNA und P.B.

Pa- tient	VI-Typ	Zeitabstand	Titer	Kli- nik	4/8- Umkehr	LGL
P.Mt.	HSV-RE	14 Tage nach	HSV 1:128	+	+	++
P.Wo.	HSV-RE	6 Tage <u>vor</u>	HSV 1:128	-	-	+
P.F.	EBV-RE	1 Tag nach	VCA			
			IgM 1: 32	+	-	-
P.Wl.	EBV-RE	4 Tage nach	VCA			
			IgM 1: 32	-	+	-+

Die M.K-Daten (Tab. 25) von CMV-Infektionsfällen ergaben eine völlige Übereinstimmung der virus-spezifischen Parameter, obwohl die Befunderhebung bereits 2 bis 18 Tage vor dem pathologischen Titeranstieg stattgefunden hatte.

In einem Fall einer HSV-Infektion stiegen die LGL bereits 6 Tage vor dem Virusnachweis an - jedoch ohne klinische Symptomatik und ohne 4/8-Umkehr.

Im Falle der EBV-Infektion waren 21 Tage nach der Titer-

Bestimmung noch keine virusspezifischen Veränderungen im M.K. bemerkbar. Bei drei Patienten konnte trotz 4/8-Umkehr, LGL-Anstieg und teilweiser Virus-Symptomatik serologisch keine Infektion nachgewiesen werden.

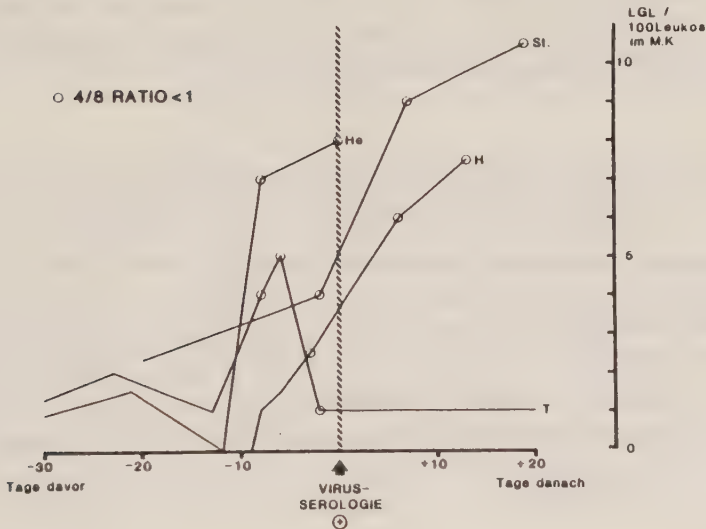
Tabelle 25: Differenz des Zeitabstandes vor und nach dem serologisch signifikanten Titeranstieg und den virusspezifischen Parametern ermittelt aus dem mononukleären Konzentrat

Pa- tient	VI-Typ	Zeitabstand	Titer	Kli- nik	4/8- Umkehr	LGL
P.E.	CMV-RE	18 Tage <u>vor</u>	KBR 1:236	+	+	+
P.T.	CMV-RE	8 Tage <u>vor</u>	IgM 1:160	+	+	+
P.He.	CMV-PRIM	8 Tage <u>vor</u>	IgM 1: 40	+	+	+
P.Go.	CMV-PRIM	2 Tage <u>vor</u>	IgM 1: 40	+	+	+
P.H.	CMV-PRIM	3 Tage <u>vor</u>	IgM 1:160	+	+	+
P.St.	CMV-PRIM	2 Tage <u>vor</u>	IgM 1:160	+	+	+
P.Wo.	HSV-RE	6 Tage <u>vor</u>	HSV 1:128	-	-	+
P.V.	EBV	21 Tage nach	VCA 1:1600	-	-	-
P.L.	-	-	-	+	+	-
P.Pe.	-	-	-	+	+	+
P.R.	-	-	-	-	+	+

Vier Verlaufskurven verdeutlichen die zeitliche Relation der LGL-Infiltration im M.K. im Zusammenhang mit dem serologischen Nachweis (Abb. 14). In allen 4 Fällen lag der Zeitpunkt der ersten 4/8-Umkehr bereits vor der serologischen Virus-Diagnose. Es konnten ebenfalls schon vorher erhöhte LGL-Werte bestimmt werden bzw. nahmen die NK-Zellen bereits Tage zuvor kontinuierlich zu.

In einem Fall verzeichneten die LGL-Zahlen bereits einen Abfall auf Normalwerte - 5 Tage bevor der serologische Beweis einer CMV-Infektion geliefert werden konnte.

Abb. 14: LGL-Verläufe im M.K. in zeitlicher Relation zum serologischen CMV-Nachweis.
Umringte Punkte repräsentieren analoge Umkehr der 4/8-Ratio.



II. ANALYSE DER MORPHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN IM FEIN- NADELASPIRAT UNTER IMMUNSUPPRESSION WÄHREND PRIMÄ- REM NIERENVERSAGEN NACH TRANSPLANTATION

Die Ursache für den Funktionsverlust eines Transplantats kann sowohl die Nephrotoxizität als auch eine immunologische Abstoßungskrise oder ein Ischämie-Schaden des Organs sein. Dieser reversiblen ischämischen Parenchymschädigung, die eine befristete Dialysetherapie in der postoperativen Phase bis zur Funktionsaufnahme des Transplantats erfordert, entspricht als lichtmikroskopisch sichtbares, morphologisches Korrelat die akute Tubulusnekrose (ATN).

In den folgenden Untersuchungen über Nierengewebszellveränderungen unter CsA im Vergleich zur konventionellen Therapie diente die akute Tubulusnekrose als Vergleichskriterium unter Ausschluß schwerer inflammatorischer Transplantatreaktionen.

1. Quantitative Auswertung der Feinnadelaspirat- Befunde unter Azathioprin und Cyclosporin A

Seit der therapeutischen Einführung von CsA konnte in den Parenchym-Befunden eine deutlich höhere Ausbeute an Endothelzellen im Aspirat vermerkt werden. Unter Berücksichtigung der Wahl des Immunsuppressivums wurden 115 FNA unter Azathioprin (AZA)- und 254 FNA unter CsA-Therapie hinsichtlich ihrer Nierengewebszell (NG/)-Populationen untersucht.

1.1 Nierengewebszellzahl-Verhältnis unter Immunsuppression

Die NGZ-Zahl-Bestimmung im Aspirat erfolgte durch parallele Auszählung der ins Blickfeld tretenden Parenchymzellen pro 100 Leukozyten. Da mit dieser semiquantitativen Methode keine Absolutzahl-Bestimmung möglich ist, bedarf die zahlenmäßige Auswertung einer Relativierung. Als aussagekräftige Methode, unbeeinflusst von unterschiedlichen Zelldichten auf den Präparaten, erwies sich die Errechnung des Zellzahl-Verhältnisses aus Endothelzellen (EZ) zu Tubuluszellen (TZ) im FNA.

Einen Vergleich der EZ/TZ-Ratio unter AZA- bzw. CsA-Therapie während der postoperativen ATN-Phase gibt Tabelle 26 wieder.

Tabelle 26: EZ/TZ-Verhältnis während postoperativ akuter Tubulusnekrose unter Azathioprin (AZA)- und Cyclosporin A (CsA)-Therapie

Therapie	AZA	CyA
FNB	n = 90	n = 204
EZ/TZ $\bar{x}$	0,83	16,9*

* $p < 0.001$

In 90 Fällen unter AZA war das EZ/TZ-Verhältnis im Mittel < 1 ($\bar{x}$ 0,83 $\pm$ 1,24). Im EZ und TZ-Aufkommen überwog die tubuläre Zellpopulation geringfügig. In den 204 FNA unter CsA-Therapie dagegen zeichnete sich eine signifikante Umkehr ($p < 0.001$, χ^2 -Test) des NGZ-Verhältnisses ab. Bei einem EZ/TZ-Wert von 16,9 ($\pm$ 22,8) verschob sich das Zellverhältnis unter CsA durchschnittlich um das 20fache zugunsten der Endothelzell-Population. Dabei traten Spitzenwerte von bis zu 400 EZ pro 100 Leukozyten auf. In 5,9 % der Fälle in der CsA-Gruppe war das EZ/TZ-Verhältnis < 1 ($\bar{x}$ 0,55 $\pm$ 0,17).

1.2 Vergleich des Endothel-/Tubuluszell-Verhältnisses mit Kontrollgruppen ohne primäres Nierenversagen

Aus beiden Therapiegruppen wurden 75 FNA von Patienten, deren Transplantate unmittelbar nach der Implantation ihre Funktion aufnahmen, zum quantitativen NGZ-Vergleich herangezogen (Tab. 27).

Unter AZA-Therapie zeigten die Fälle mit ATN ($n = 90$) und ohne ATN ($n = 25$) keine Unterschiede hinsichtlich ihrer NGZ-Verteilung. Auch innerhalb der ATN-Gruppe unterscheiden sich die EZ/TZ-Werte unter Berücksichtigung der postoperativen Dialysedauer bzw. des Schweregrades der ATN nicht.

Die Vergleichsgruppen mit und ohne ATN unter CsA-Therapie wiesen jeweils den CsA-typisch hohen Endothelzell-Anteil an der NGZ-Verteilung auf und differierten nur geringfügig in den Einzelergebnissen.

Tabelle 27: EZ/TZ-Ratio bei sofortiger postoperativer Transplantatfunktion (keine ATN) im Vergleich mit primärem Nierenversagen nach Transplantation (ATN) unter AZA und CsA

AZATHIOPRIN:

n=25	KEINE ATN	EZ/TZ $\bar{x}$	0,88 $\pm$ 0,75
	ATN : postop. Dialyse		
n=33	bis 10.Tag	$\bar{x}$	0,99 $\pm$ 1,73
n=57	länger als 10 Tage	$\bar{x}$	0,73 $\pm$ 0,82

CYCLOSPORIN A :

n=50	KEINE ATN	EZ/TZ $\bar{x}$	19,7 $\pm$ 34,4
	ATN : postop. Dialyse		
n=62	bis 10.Tag	$\bar{x}$	12,4 $\pm$ 13,5
n=45	länger als 10 Tage	$\bar{x}$	17,7 $\pm$ 25,9

1.3 Vergleich der Endothel-Tubuluszell-Ratio unter Berücksichtigung von zellulärer Inflammation und Virusinfektion

In der quantitativen Auswertung der aspirierten NGZ wurde das EZ/TZ-Verhältnis auch nach dem Grad der zellulären Inflammation differenziert. Außerdem wurden die Fälle mit serologisch nachgewiesenen Virusinfektionen in den Vergleich miteingeschlossen (Tab. 28).

Weder unter AZA- noch unter CsA-Behandlung unterschieden sich die Fälle ohne ZTR (C.I. < 3) und mit ZTR (C.I. $\geq$ 3) entsprechend ihrer Parenchymzell-Verteilung; d.h. auch hohe zelluläre Infiltration im Transplantat ändert nichts am EZ/TZ-Verhältnis.

Gleichfalls tritt während Virusinfektion (AZA n = 8 und CsA n = 31) keine gravierende Veränderung der NGZ-Zahl-Verhältnisse innerhalb der Therapiegruppen ein.

Tabelle 28: EZ/TZ-Ratio unter Berücksichtigung von ZTR und Virusinfektion unter AZA- und CsA-Therapie

AZATHIOPRIN			CYCLOSPORIN A		
FNA	EZ/TZ		FNA	EZ/TZ	
n=90	$\bar{x}$	0,8 $\pm$ 1,2	n=204	$\bar{x}$	16,9 $\pm$ 22,8
n=62	c.I. <3	0,9 $\pm$ 1,4	n=113	c.I. <3	14,3 $\pm$ 17,3
n=28	c.I. $\geq$ 3	0,8 $\pm$ 0,9	n=91	c.I. $\geq$ 3	20,1 $\pm$ 26,0
n=8	VIRUS	0,7 $\pm$ 0,6	n=31	VIRUS	11,7 $\pm$ 12,0

2. Qualitative Auswertung der Feinnadelaspirat- Befunde unter Azathioprin und Cyclosporin A

Die ischämiebedingten Schäden bei akuter Tubulusnekrose betreffen vornehmlich die Tubuluszellen des proximalen und distalen Konvoluts. In weitaus geringerem Maße treten morphologische Veränderungen an den Endothelzellen auf. Unter ATN-Bedingungen infiltrieren ins Transplantat hauptsächlich phagozytose-aktive Monozyten und Makrophagen, im Sinne einer Abräumreaktion nekrotischer Zellen.

Für unsere Untersuchungen wurden die pathologischen Veränderungen im Befundbogen (Material und Methoden, 4.6) erfaßt und der Grad des Parenchymschadens bei akuter Tubulusnekrose ausgewertet.

2.1 Gewebszellmorphologie bei primärem Nierenversagen nach Transplantation

a) Gewebszellmorphologie unter Azathioprin-Behand- lung (AZA)

Zur Bewertung der ATN-Morphologie unter konventioneller Therapie dienten 20 repräsentative FNA. In allen befundeten Aspiraten waren Zellkern- und Zytoplasma-Veränderungen anzutreffen. Mehr als 2/3 (= 69 %) der registrierten TZ (Tubuluszellen) wiesen Kernentrübung bis hin zur Kernpyknose und teilweise Vakuolisierung auf. Zytoplasmatische Schwellung mit unregelmäßiger, schlecht abgrenzbarer und schlieriger Vakuolisierung zeigten 84 % der befundeten TZ. Phagozytose-Zeichen und Granulationen konnten zwar in 45 % der FNA gefunden werden,

betroffen waren jedoch nur sehr wenige TZ pro Präparat. Ein typisches Morphologie-Muster unter AZA-Behandlung zeigt Abb. 16.

b) Gewebszellmorphologie unter Cyclosporin A-
Therapie (CsA)

Die ATN-Morphologie unter CsA-Einfluß konnte unter Berücksichtigung unterschiedlicher CsA-Vollblutspiegel differenzierter aufgeschlüsselt werden. Bei 57 bewertbaren FNA standen zeitlich analoge CsA-Blutspiegel-Bestimmungen (± 2 Tage) zur Verfügung und erlaubten die Einteilung in 3 Gruppierungen:

- 11 Fälle mit CsA-Spiegel unter 500 ng/ml,
- 15 Fälle im Bereich zwischen 500 bis 1000 ng/ml und
- 31 Fälle mit CsA-Blutspiegelwerten über 1000 ng/ml.

Mit zunehmender Höhe des CsA-Spiegels wurden 20 bis 40 % kerngeschädigte TZ mit Schwellung und Entrundung gezählt. Ein sehr uneinheitliches Bild der zytoplasmatischen Zellveränderungen konnte bei durchschnittlich 40 bis 63 % der ausgewerteten TZ beobachtet werden. In ein und demselben FNA kamen neben leichten bis starken Schwellungsgraden unterschiedlich starke Vakuolisierungsgrade vor. Die Art der Vakuolisierung konnte zwischen fein- und grobbläsig, regelmäßig und unregelmäßig, sowie zwischen klarem und schlierigem Vakuoleninhalt variieren. Phagozytose-Zeichen und unterschiedliche Granulationsformen traten pro FNA zwischen 36 und 87 % in Relation zur Höhe des CsA-Spiegels in zunehmendem Maße auf.

Insgesamt zeigte sich ein sehr inhomogenes Morphologie-Muster während CsA-Behandlung (Abb. 17).

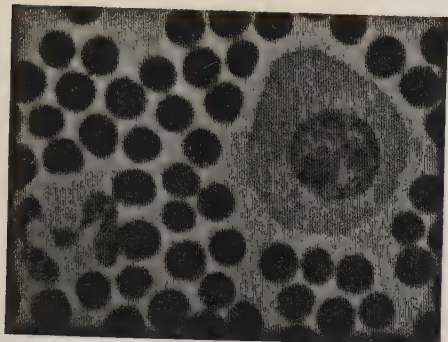


Abb. 15:

Intakte Tubuluszelle

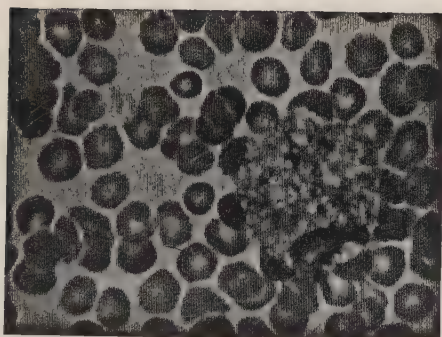


Abb. 16:

ATN-Morphologie un-
ter Azathioprin

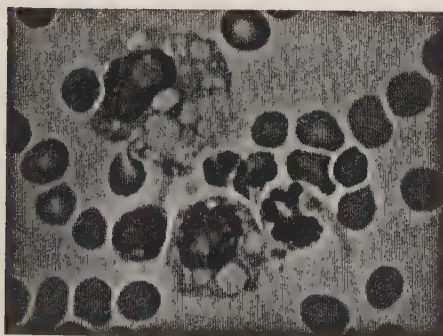


Abb. 17:

ATN-Morphologie un-
ter Cyclosporin A

2.2 "Stanzlöcher" als morphologische Veränderung unter CsA

Unter CsA-Therapie fiel vor allem eine besondere Art der Vakuolisierung, die sogenannten "Stanzloch-Vakuolen", vermehrt auf. Diese teils solitär, teils mehrfach im Zytoplasma vorkommenden, großen, scharfrandigen, klaren Vakuolen sind gut von anderen Vakuolisierungsformen abzugrenzen. Zusätzlich wurde beim Auftreten solcher zytoplasmatischen "Löcher" häufig ein intakter Zellkern registriert (Abb. 18).

a) Vorkommen im Aspirat in Relation zur CsA-Blut- spiegel-Höhe

Bei CsA-Spiegel kleiner 500 ng/ml kamen in 9 % der FNA diese "Stanzlöcher" (SL) vor. Im Vergleich dazu konnten im Bereich zwischen 500 und 1000 ng/ml bereits 60 % der FNA, bei Werten über 1000 ng/ml in fast allen Aspiraten (97 %) diese typischen Vakuolen vermerkt werden (Abb. 21). Nahezu alle FNA, in deren Präparaten keine SL auffindbar waren, wiesen großteils CsA-Spiegel unter 1000 ng/ml, d.h. im therapeutischen Bereich, auf. In diese Gruppe fallen Blutspiegel-Werte zwischen 100 und 1200 ng/ml, der Medianwert liegt bei 400 ng/ml.

In den 45 FNA mit "SL" zeichnet sich dagegen ein signifikanter Unterschied ($p < 0.001$) der Häufigkeitsverteilung entsprechend den CsA-Blutspiegelwerten zwischen 250 und 2000 ng/ml ab. In dieser Verteilung liegt der Median bei 1250 ng/ml; d.h., daß bei Blutspiegelwerten über 1000 CsA im toxischen Bereich alle FNA "Stanzloch-Vakuolen" aufwiesen. (Ein Ausnahmefall liegt in der Vergleichsgruppe ohne "SL" bei 1200 ng/ml).

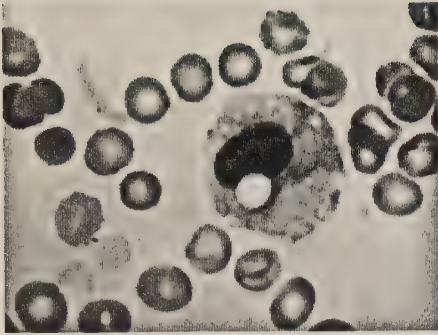


Abb. 18:

Große, scharfrandige
Stanzloch-Vakuole bei
intaktem Kern unter
CsA-Therapie

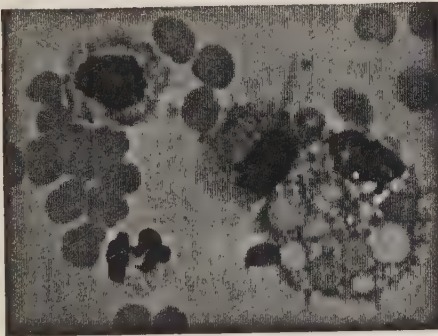


Abb. 19:

Tubuluszelle mit Kern-
entrundung, Zytoplasma-
schwellung, unregelmä-
Biger Vakuolisierung
und Erythrophagozytose
unter CsA-Therapie

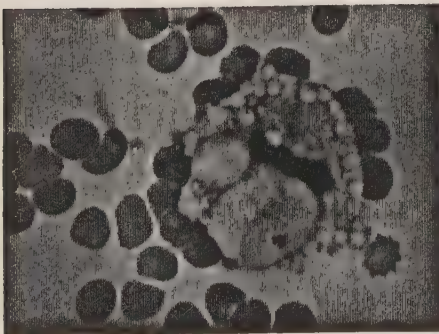
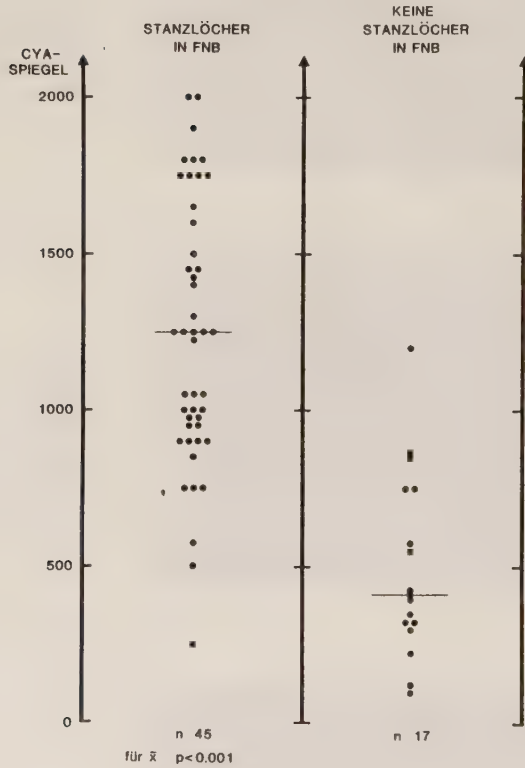


Abb. 20:

Massiver Tubuluszell-
schaden unter CsA-
Therapie

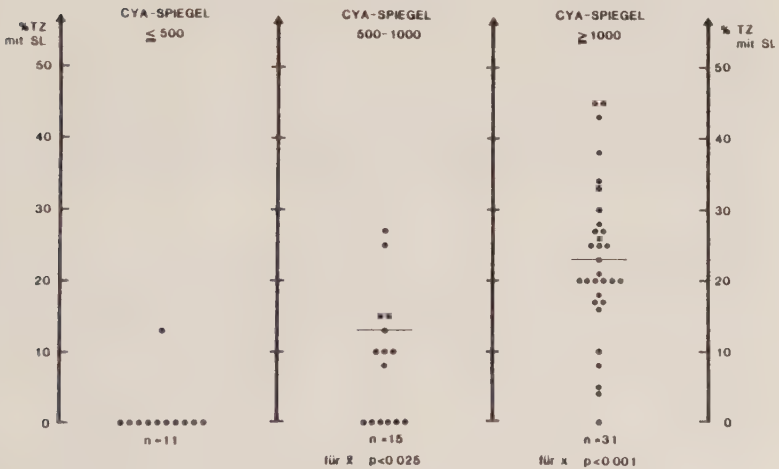
Abb. 21: Vorkommen der "Stanzlöcher" (SL) im Aspirat in Relation zur CsA-Blutspiegel-Höhe (Signifikanz nach Mann-Whitney-Test)



2.2 b) Häufigkeit typisch vakuolisierter Tubuluszellen
pro Aspirat in Relation zu definierten CsA-Blut-
spiegel-Bereichen

Im CsA-Vollblutspiegel-Bereich unter 500 ng/ml beobachteten wir nur 1 % der TZ-Population mit diesen SL-Vakuolen. Im Mittelbereich (500 - 1000 ng/ml) traten bereits 8,9 % der TZ mit SL, im Bereich > 1000 ng/ml durchschnittlich 22,9 % geschädigte Tubuluszellen auf. Der prozentuale Anteil der stanzlochartig-vakuolisierten TZ innerhalb der befundeten TZ-Population wurde in Relation zu bestimmten CsA-Spiegel-Bereichen gesetzt (Abb. 22).

Abb. 22: Häufigkeit typisch vakuolisierter Tubuluszellen (TZ mit SL) pro FNA in Relation zu definierten CsA-Blutspiegel-Bereichen (Signifikanz nach Mann-Whitney-Test)



Während in 10 von 11 Fällen bei CsA-Spiegel unter 500 ng/ml keine TZ mit "SL" auffindbar waren (nur in einem Fall waren 13 % der TZ betroffen), zeichnete sich bereits ein signifikanter Unterschied ($p < 0.0025$) in der Verteilung innerhalb CsA-Spiegel von 500 - 1000 ng/ml ab. Zwischen 0 und 27 % der TZ im aspirierten Material hatten "Stanzlöcher"; der Median lag bei 13 %. Die 31 Fälle im toxischen CsA-Blutspiegel-Bereich (größer 1000 ng/ml) unterscheiden sich wiederum signifikant von den Vergleichsgruppen ($p < 0.001$). Hier wurden bis zu 45 % der TZ mit "Stanzlöchern" beobachtet, der Medianwert lag bei 23 %; d.h. in 30 von 31 Fällen waren im toxischen Blutspiegel-Bereich ein gewisser Prozentsatz der TZ typisch stanzlochartig vakuolisiert.

2.3 Vergleich der Zellmorphologie-Befunde beider Therapieformen

Zu diesem Zweck dient die Gegenüberstellung der Tabellen 29 und 30:

Als Gesamtüberblick ist für beide Therapiegruppen noch einmal die quantitative Auswertung ergänzend aufgelistet. Unter AZA-Therapie ergab sich eine nahezu gleich hohe EZ- und TZ-Ausbeute im Aspirat.

Unter CSA-Einfluß sind die EZ/100 Leukos bis zu 10fach erhöht. Die in Abhängigkeit zur Höhe des CsA-Vollblutspiegels ansteigende TZ-Zahl/100 Leukos ist jedoch nicht signifikant verändert ($p < 0.25$).

Tabelle 29: ATN-Morphologie-Befunde unter AZATHIOPRIN-Behandlung

Befunde in FNB	n = 20
EZ/100 Leukos	7,5
TZ / 100 Leukos	8,0
Verhältnis EZ / TZ	0,9
% TZ-Schäden im Kern im Plasma	69,0 84,0
"Stanzlöcher" % FNB	0
% TZ	0
Erythrophago. % FNB	10,0
% TZ	1,2
Zelleinschl. % FNB	45,0
+ Granula % TZ	8,9

Tabelle 30: ATN-Morphologie-Befunde unter Berücksichtigung definierter CYCLOSPORIN A-Blutspiegel-Bereiche

Befunde in FNB	CyA - Vollblutspiegel		
	< 500 n = 11	500-1000 n = 15	> 1000 n = 31
EZ / 100 Leukos	78,7	48,1	76,9
TZ / 100 Leukos	5,3	8,4	12,4
Verhältnis EZ / TZ	15,4	7,8	12,8
% TZ-Schäden im Kern im Plasma	21,0 40,0	39,0 71,0	40,0 63,0
% FNB "Stanzlöcher"	9,0	60,0	97,0
% TZ	1,2	8,9	22,9
Erythro- phago. % FNB	9,0	47,0	39,0
% TZ	1,0	3,1	3,8
Zelleinschl. % FNB	36,0	47,0	87,0
+ Granula % TZ	4,8	6,2	13,0

Der Vergleich der morphologischen Qualität unter AZA und CsA ergibt folgende Befunde:

- Auch unter Berücksichtigung hoher CsA-Vollblutspiegel sind geringere TZ-Kernschäden als unter AZA-Behandlung zu verzeichnen. Bei CsA-Spiegeln unter 500 ng/ml erscheinen durchschnittlich nur 21 % geschädigte TZ;
- die zytoplasmatischen Schäden betreffend:

unter <u>CsA</u>	40 - 63 % der TZ,
unter <u>AZA</u> durchschnittlich	84 % der TZ;
- während unter CsA die sogenannten "Stanzlöcher" analog zum ansteigenden CsA-Blutspiegel vermehrt vorkommen, wurde das Phänomen der Stanzlöcher unter AZA-Therapie nie beobachtet;
- unter CsA-Einfluß trat vermehrt Erythrophagozytose (Abb. 19) im Aspirat auf; zwischen 9 und 47 % aller Asparate zeigten diese Phagozytoseaktivität bei durchschnittlich 1 - 3,8 % betroffener TZ, in 10 % der FNA unter AZA bei durchschnittlich 1,2 % der TZ;
- im toxischen CsA-Spiegel-Bereich kamen gehäuft Zell-einschlüsse und Granulationen pro FNA vor; durchschnittlich zeigten bis zu 87 % der Asparate diese morphologischen Erscheinungen.

D. DISKUSSION

1. Zu Material und Methoden

Seit der ersten, 18 Jahre zurückliegenden Anwendung der Feinnadelbiopsie an Nierentransplantaten beim Menschen durch Pasternack (129) und deren klinischer Einführung durch P. Häyry (1979) entwickelte sich die Feinnadelaspirationszytologie nach jahrelanger Grundlagenforschung unter der Beteiligung mehrerer Transplantationsforschungszentren (54, 55, 56, 60, 130, 163, 185, 186) und internationaler Kooperation bei regelmäßigen Workshops zu einer klinisch relevanten Methode. Sie erfaßt immunologisch vermittelte, zelluläre Abwehrvorgänge und morphologische Gewebsalterationen im Transplantat und ermöglicht deren konsekutive diagnostische und therapeutische Einstufung.

Die FNAC sollte nie als Alternativmethode zur konventionellen Stanzbiopsie bzw. zu histologischen Schnitten angesehen werden, sondern zusätzlich differentialdiagnostisch wertvolle Informationen liefern.

Die Stanzbiopsie beinhaltet als invasive Methode ein signifikantes Blutungsrisiko sowie die Gefahr von arteriovenöser Fistel- und Aneurysmabildung (103, 193) mit resultierendem Transplantatverlust. Sie erlaubt keine Durchführung in kurzen Abständen und bedarf daher einer strengen Indikationsstellung (103). Trotzdem besitzt die Stanzbiopsie eine unangefochtene und unersetzbare Stellung in der Diagnose pathologischer Gewebsveränderungen (121). Durch licht- und elektronenmikroskopische sowie durch immunfluoreszenztechnische und immunhistologische Methoden umfaßt ihr Spektrum Veränderungen am ge-

samten Nephron, d.h. sie kann zwischen Transplantatnephritis, -vaskulopathie und -glomerulopathie in akuter und chronischer Form differenzieren; jedoch nur diffuse Prozesse sicher erfassen (103).

Die Vorteile der FNB liegen dagegen - neben der einfachen, billigen und schnellen Methodik - vor allem in ihrer risikoarmen und täglichen Anwendungsmöglichkeit (57, 60, 64). Mit Hilfe der FNAC können durch kontinuierliche Verlaufskontrolle Beginn und Intensität zellulärer Prozesse im Transplantat verfolgt werden. Die Auswertung basiert auf zytologischer Einzelzell-Befundung und ermöglicht daher speziell die Differenzierung von Quantität, Zusammensetzung und Aktivierungsgrad immunkompetenter Zellen. Gleichzeitig erfolgt die Untersuchung der unterschiedlichen Parenchymzellmorphologie tubulärer und endothelialer Strukturen (57, 64).

Das hohe Maß an Aussagekraft und Zuverlässigkeit der Methode beweist die von mehreren Transplantationszentren ermittelte gute Übereinstimmung (bis zu 80 %) mit dem histologischen Befund (11, 24, 34, 101, 102, 104). Bereits vor klinischer Symptomatik und spezifischen Serumkreatinin-Anstiegen konnten in der FNB akute zelluläre Reaktionen in situ diagnostiziert werden. Feinna-delbioptisch nicht aufgedeckte Abwehrkrisen zählten meist zu den chronischen bzw. vaskulären Abstoßungsvarianten (24).

Diese Ergebnisse rechtfertigen den Einsatz der FNAC als wichtigen diagnostischen Parameter vor allem in den ersten postoperativen Monaten. In dieser Phase bedarf es einer gezielten Differentialdiagnose zwischen zellulärer Transplantatinfektion, akuter Tubulusnekrose aufgrund von primärem Nierenversagen, medikamenteninduzier-

ter Toxizität und Virusinfektion. Alle diese Komplikationen gefährden das Transplantat und erfordern spezielle, teilweise sogar gegensätzliche therapeutische Konsequenzen.

Die Fehlerquellen dieser semiquantitativen Methode bei der Interpretation von Zellinfiltrationen und Parenchymzellschäden im Transplantat liegen in der variablen Blutkontamination des Aspirats und in der möglichen zu geringen Zellausbeute der FNB.

Erste wird durch die "Inkrement Methode" aufgewogen; die Zelldifferenzierung erfolgt aus dem FNA und peripherer Blutprobe, die Blutwerte werden daraufhin von den Bipsiewerten abgezogen. Nach Multiplikation mit spezifisch auf die immunologische Potenz der immunkompetenten Zellen abgestimmten Korrekturfaktoren summiert sich ein "Gesamt-Corrected-Inkrement" als Maß für die tatsächliche Zellinfiltration in situ.

In unseren Auswertungen wurden Infiltrate in Aspiraten mit Gesamt-Corrected-Inkrement ≥ 3 als zelluläre Transplantatreaktion definiert. Andere Autoren korrelierten FNAC-Bewertungsskalen mit C.I. größer gleich 3,5 in signifikanter Weise ($p < 0.001$) mit Anwesenheit oder Beginn akuter Abstoßungsreaktionen (24).

Die zweite Fehlerquelle wurde in unseren Untersuchungen durch den Ausschluß aller FNB beseitigt, die nicht dem Bewertbarkeits-Kriterium - mehr als 10 Nierengewebszellen tubulärer und endothelialer Herkunft pro 100 Leukozyten - entsprachen. Von E. Willebrand und P. Häyry wurde anhand einer Doppel-Biopsie-Studie ein Mindestgehalt an 7 Tubuluszellen pro 100 inflammatorische Zellen ermittelt und als Voraussetzung für ein repräsentative

tives Aspirat, d.h. eine bewertbare Biopsie, postuliert (189). Eine zusätzliche Biopsiequalitätskontrolle bietet die Coulter-Counter-Meßtechnik zur Bestimmung eines "Kontaminationsfaktors" und damit zur Erfassung der Zelldichte des Aspirats (100, 102).

Die Anwendung der FNAC ist jedoch nicht nur auf die Untersuchung von Nierentransplantaten beschränkt. Die Methode wird auch erfolgreich in der Tumordiagnostik und zum Monitoring nach Leber- und Pankreas-Transplantation sowie modifiziert nach Lungentransplantation (mittels bronchioalveolärer Lavage) eingesetzt.

Im Rahmen der zytologisch-immunologischen Blutdiagnostik diente in unseren Untersuchungen das mononukleäre Konzentrat als Indikator für intravasale bzw. systemische Vorgänge in der postoperativen Phase. Das mononukleäre Konzentrat steht als einfache, nicht invasive, sogar mehrmals täglich anwendbare Methode für lichtmikroskopische und immunfluoreszenztechnische Untersuchungen zur Verfügung. Durch Dichtegradienten-Zentrifugation wird eine spezifische Ausbeute an immunkompetenten, mononukleären Zellen des peripheren Blutes isoliert. In der Differenzierung der Häufigkeit, Verteilung und des Aktivierungsstadiums dieser Zellen wird nach Zyto-Zentrifugation und Färbung in gleicher Weise wie beim FNA verfahren. Die Weiterverarbeitung des MK zur Lymphozytensubpopulationsbestimmung erfolgt durch die Markierung mit monoklonalen Antikörpern; deren klinischer Einsatz ist als Routineuntersuchungsmethode bereits etabliert (105, 137, 140).

Das MK ermöglicht Verlaufsbeobachtungen der funktionellen Lymphozytensubsets und deren Abstoßungs- bzw. virusbedingt unterschiedliche Fluktuationen und liefert damit wertvolle differentialdiagnostische Hinweise (29, 35, 142, 160).

Im zytoimmunologischen Monitoring nach Herztransplantation werden die zellulären Veränderungen im MK als diagnostische Parameter mit hoher Sensitivität zur frühzeitigen Erkennung von Abstoßungskrisen erfolgreich eingesetzt (8).

Die Durchsicht des untersuchten Patientenkollektivs zeigte keine Unterschiede in bezug auf Zusammensetzung, Altersverteilung, Transplantationshäufigkeit, Empfänger- und Spenderauswahl, Inzidenz zu Virusinfektionen und Grunderkrankungsursachen im Vergleich zu Vorberichten (102, 147, 160). Bei der Übersicht der Patientenzahlen in den Jahren 1981 - 1983 in Relation zur Anzahl der repräsentativen FNB ergab sich nur eine geringe Ausbeute an bewertbaren Patientenverläufen; d.h. nur selten standen kontinuierliche FNB-Serien im 2- bis 3-Tage-Rhythmus zum Verlaufs-Monitoring zur Verfügung, wie es an anderen Zentren konsequent praktiziert wird (11, 24, 57, 64).

2.1 Charakteristika der "Large Granular Lymphocytes" (LGL)

Bereits 1911 beschrieben Pappenheim und Ferrata (126) eine Blutzellpopulation mit lymphozytoider Morphologie und intrazytoplasmatischer, azurophiler Granulierung. Sie bezeichneten diesen Zelltypus als "monozytoide" bzw.

"leukozytoide" Lymphozyten. Timonen und Saksela (1979/1981) (151, 171, 173) typisierten diese Gruppe von mononukleären Zellen phänotypisch als große granulierte Lymphozyten (LGL) und stellten sie als morphologisches Korrelat der funktionell charakterisierten NK- (natural killer)- Zellpopulation dar. LGL werden als Effektorzellen mit NK-Aktivität für die natürliche Cytotoxizität gegen Target-Zellen verantwortlich gemacht (173). Bereits 1975 definierten Herberman (77) und Kiessling (95) die NK-Aktivität im Tiermodell als spontane cytotoxische Reaktion gegen virusinfizierte Zielzellen und gegen spezifische Tumor-Targets ohne vorherige Sensibilisierung. Im Unterschied dazu bedürfen die cytotoxischen T-Zellen einer antigenen Stimulation, bevor sie Zielzellen mit dem entsprechenden Antigenbesatz lysieren können (190). Als funktionelle Vermittler der ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) sind dagegen K-Zellen charakterisiert; diese phänotypisch heterogene Subpopulation ist teilweise mit den LGL identisch.

Im Blut von gesunden Probanden beträgt der LGL-Anteil ca. 10 % an der Gesamtlymphozytenpopulation bzw. zwischen 2 und 6 % im leukozytären Differentialblutbild (173). Die Mehrzahl der LGL bzw. das Gros der NK-Aktivität ist im Blut und in der Milz vorhanden, in weit aus geringerem Ausmaß dagegen im Thymus und in den Lymphknoten.

Für morphologische, immunologische, cytochemische und funktionelle Untersuchungen der LGL-Population erfolgt deren Separation aus dem peripheren Blut durch diskontinuierliche Percoll-Dichtegradient Zentrifugation (172). Diese von Timonen et al. beschriebene Methode ermöglicht durchschnittlich eine mehr als 90 %ige Anreicherung der Zellen.

Die morphologischen Kriterien zur LGL-Identifizierung

wurden zuerst von Timonen (171) und später von anderen Autoren (45, 90) festgelegt. In der panoptischen Darstellung nach Pappenheim (Abb. 1, 2) erscheinen diese mononukleären Zellen in der Form von großen Lymphozyten mit einem Zelldurchmesser von 10 - 16 μm . Der meist nierenförmige, stark basophile Zellkern enthält kompaktes, retikulärstrukturiertes Chromatin. Bei relativ hohem Zytoplasma/Kern-Verhältnis sind zahlreiche zytoplasmatische, azurophile Granula, die vornehmlich paranukleär und in der Kernbucht lokalisiert sind, charakteristisch.

Die Ultrastruktur der LGL wurde u.a. von Grossi und Ferrarini (50) beschrieben. Das elektronen-mikroskopische Bild (Abb. 23) zeigt eine unregelmäßige Zelloberfläche mit kurzen Mikrovilli. Das reichliche Zytoplasma enthält wenig Mitochondrien und isoliert kurze Stränge von rauhem endoplasmatischem Retikulum. Auffällig sind der ausgedehnte Golgi-Apparat, einige vornehmlich in der Kernbucht gelegene Vesikel und einige Matrix-beinhaltende und membranumhüllte Granula. Gastl (45) und Huhn (90) beschrieben diese typischen Organellen mit ultrastrukturellen Zentren und ordneten diese den licht-mikroskopisch sichtbaren azurophilen Granula zu. Zusätzlich enthält ein gewisser Prozentsatz der LGL tubulär strukturierte, parallel angeordnete Zelleinschlüsse (90).

Aufgrund der Heterogenität der Oberflächenantigene der NK-Zellen war deren eindeutige Identifizierung als lympho- oder myelopoetische, bzw. monozytoide Zellreihe trotz differenzierter immunologischer und cytochemischer Untersuchungen bisher nicht geklärt. Ausgehend von Vorbefunden und eigenen Untersuchungen stellte Ortaldo (125) die LGL-Population als separate NK-Zell-Linie zur Dis-

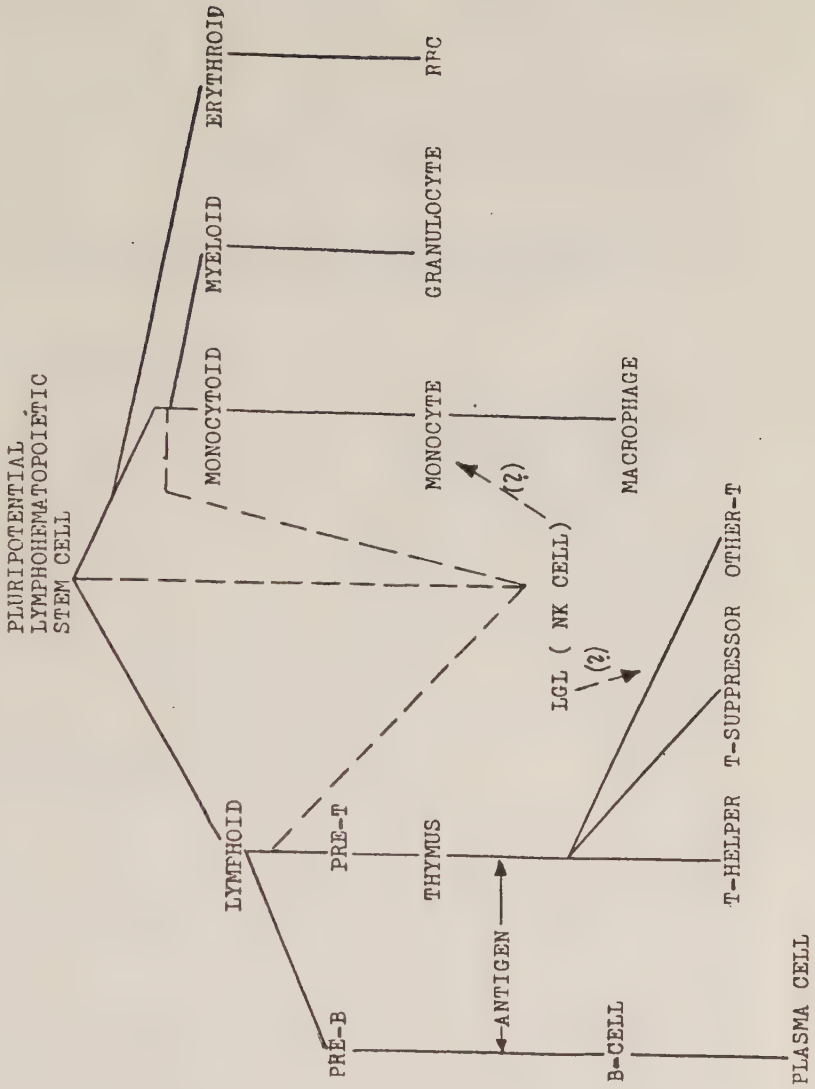
Abb. 23:

I. Characteristics of NK Cells



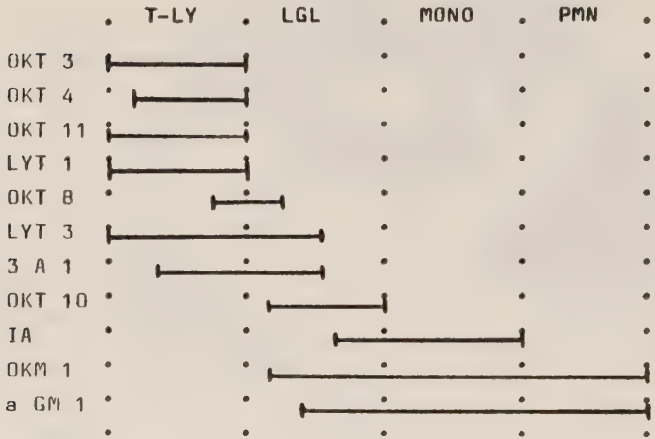
kussion; d.h. LGL würden sich unter gegebenen Entwicklungseinflüssen aus einer pluripotenten Blut-Stammzelle ausdifferenzieren. Abb. 24 gibt das von Ortaldo modifizierte Schema der NK-Zell-Abstammung wieder. Auch andere Autoren erklärten eine massive Depression der NK-Aktivität bei Erkrankung oder Bestrahlung des Knochenmarks als Hinweis für die NK-Zell-Abstammung aus dem Knochenmark (46, 66)!

Abb. 24: Modellvorschlag zur LGL-Abstammung von Ortaldo (125),
(nach Mc Cullogh und Till, 1971)



Zur Identifizierung des antigenen Phänotyps bedienten sich Ortaldo (124, 125) und Zarling (191, 192) monoklonaler und poliklonaler Antikörper, die entweder für Lymphozyten, Monozyten oder PMN-Leukozyten spezifisch waren (Abb. 25). NK-Zellen stellen einen Teil der sogenannten Null-Zellpopulation dar, d.h. Fehlen von typischen T- und B-Zell-Oberflächenmarkern.

Abb. 25: Reaktionsbreite von monoklonalen und anderen Antikörpern mit verschiedenen leukozytären Subpopulationen (nach Ortaldo (125))



LGL tragen einerseits Oberflächenantigene, die teilweise mit T-Ly-Markern, wie 3 A 1 und OKT 8 (gegen cytotoxische/suppressor T-Zellen) und LYT 3 (gegen Schaferythrozyten-Rezeptor) reagieren; andererseits besitzen sie Antigenstrukturen monozytärer und myelozytärer Natur, die durch Antikörper, wie IA, OKM 1 und a GM 1 aufgedeckt wurden (191, 192). 60 % der LGL sind OKT 10 positiv; der Rezeptor für diesen Antikörper ist nicht auf

reifen T-Lymphozyten, sondern auf unreifen Thymozyten und einigen Knochenmarkszellen nachweisbar.

Abo et al. (2) entwickelten den MCAK HNK-1 (Leu 7), der gegen die in Kultur angereicherte Zell-Linie HSB-2 gerichtet ist. Das HNK-1 spezifische Antigen definiert eine Subpopulation von granulierten Lymphozyten mit NK- und K-Zell-Funktion und ist auf der Oberflächenmembran und im Zytoplasma der LGL immunfluoreszenz-technisch (mittels FACS) selektiv zu 92 % nachweisbar (1).

Während immunologische Kriterien den ambivalenten Charakter der LGL-Population hervorheben, unterstreichen cytochemische Untersuchungen deren lymphozytäre Klassifizierung (45, 50, 90, 171, 173). Das lysosomale System der NK-Zellen weist keine Phagozytose-Aktivität auf. Die "low density fraction" der LGL besitzt nur geringe Oberflächenadhärenz (an Glas und Plastik). Sie sind Fc-IgG-Rezeptor positiv und in der Myelo- und Makrophagen-Peroxidase-Reaktion negativ. Außerdem enthalten LGL verschiedene saure Hydrolasen, die spezifische Marker des lysosomalen Systems darstellen; d.h. sie sind ANAE (Alpha-naphtyl Acetat Esterase) und saure Phosphatase positiv (50).

Elektronenmikroskopische Studien identifizierten durch Spezialfärbungen die LGL-spezifischen Granula als Lysosomen. Unter verlängerten Inkubationsbedingungen nehmen die Granula an Zahl und Größe zu; Granulierung könnte somit den LGL-Reifungsgrad repräsentieren (50).

Hinsichtlich ihrer Funktion unterscheiden sich die NK-Zellen wiederum spezifisch von den cytotoxischen T-Zellen. Die NK-Zellfunktion ist unabhängig von Antigenerkennung und Sensibilisierung (86). Die NK-Aktivität repräsentiert eine Art Primitiv-Funktion des Immunsystems

zur Eliminierung stark alterierter Zellen. Evolutionsgemäß entwickelten NK-Zellen spezielle Eigenschaften im Sinne einer zytotoxischen und sekretorischen Aktivität gegen virusinfizierte Zellen, sowie im Sinne einer Immunüberwachung bzw. -abwehr gegen Tumorzellbildung (36, 78, 80, 81, 146).

Es konnte eine hochsignifikante Korrelation ($p. < 0.001$) zwischen LGL-Prozentsatz und Bindungs- bzw. Lysekapazität gegen sensitive Target-Zellen (K 562-Tumorzellen) sowohl bei Normalpersonen als auch bei Patienten mit malignen und nicht malignen Erkrankungen erstellt werden (45, 46, 171).

Zur Messung der NK-Aktivität dienen verschiedene Methoden:

Konjugations-Assay:

Messung der Bindungskapazität der K-562-Tumor-Target-Zellen (171, 173),

Cytotoxizitäts-Assay:

^{51}Cr markierte K-562-Target-Zellen werden mit den Effektorzellen inkubiert und anschließend die Chromfreisetzung gemessen (36),

Einzel-Zell-Assay in Agarose:

Messung der Killerzell-Häufigkeit unter der LGL-Population (% der gebundenen Zellen, die "killen") (174).

Neben IL 2 stellt Interferon einen potenten Aktivierungsfaktor der NK-Zellfunktion dar (79, 165, 174). Interferon bewirkt eine Steigerung der cytotoxischen Aktivität der LGL durch Rekrutierung bzw. Aktivierung von NK-Zell-Vorstufen und fördert deren Differenzierung zu funktionellen Effektorzellen. Die Precursor-Zellen können zwar die Targetzelle binden, jedoch erst nach Aktivierung "killen". Zusätzlich steigert Interferon direkt die Lyse-Rate (= Killer-Kapazität) der reifen Zellstufen

und fördert einen "Recycling-Mechanismus" von NK-Zellen.

Die vielen differenzierten Studien zur Untersuchung der NK-Zell-Funktion brachten trotz wichtiger Aufschlüsse auch abweichende, sogar völlig divergente Ergebnisse, die die klinische, diagnostische Bewertung der NK-Aktivität bei verschiedenen Erkrankungen erschweren.

Bei vielen unbehandelten malignen, chronischen und autoimmunologischen Erkrankungen (wie z.B. Tumoren, Leukämie, Kollagenosen, MS und AIDS) und therapiebedingt (Bestrahlung, Chemotherapie, Immunsuppression nach Transplantation) wurde reduzierte NK-Aktivität in Verbindung mit geringeren LGL-Zahlen beobachtet. Dagegen stand eine Steigerung der NK-Aktivität in Zusammenhang mit atopischer Dermatitis, chronischer Hepatitis, Graft vs host disease und zum Teil mit Transplantatabstoßung (46, 65, 94, 112, 146).

2.2 LGL bei Abstoßungsreaktion und Virusinfektion

Die Charakterisierung der LGL als potente cytotoxische Zellpopulation in der Immunabwehr des Körpers führte zu Untersuchungen über deren funktionelle Beteiligung im immunologischen Reaktionskomplex nach Transplantation. In der Literatur wird eine signifikante Reduktion der NK-Aktivität in Verbindung mit Abnahme der LGL-Häufigkeit bei transplantierten und konsekutiv immunsupprimierten Patienten häufig beschrieben (39, 40, 47, 94, 112, 135, 181, 182, 183).

Im Vergleich zu Normalpersonen ist die NK-Aktivität bei transplantierten Patienten durchschnittlich auf ein Viertel reduziert und der LGL-Prozentsatz ist im Mittel auf

4 % im Vergleich zu 13 % in der Kontrolle abgesunken (135). Diese von Ramsey angegebenen Werte entsprechen den LGL-Auszählungen aus peripherem Blut (P.B. und MK) in unseren Ergebnissen. Ähnliche zahlenmäßige Veränderungen der Zellrelationen beschrieb auch Gastl (47) unter den gleichen Auswertungsbedingungen. Ramsey wies bei normaler LGL-Funktion eine signifikante Korrelation zwischen der NK-Aktivität und der LGL-Anzahl nach (135). Diese Beobachtung und Vorbefunde veranlaßten uns, Veränderungen der LGL-Fluktuationen mit entsprechenden NK-Aktivitätszu- und -abnahmen gleichzusetzen.

Für das Absinken der NK-Aktivität wird der Immunsuppressions-Effekt verantwortlich gemacht (39, 47, 135, 181); der Grad der NK-Depression steht in Relation zur Intensität und Dauer der Immunsuppression (94, 135, 181). Während Gastl (47) und Waltzer (1983) die Abnahme der NK-Aktivität unabhängig von der Wahl des Immunsuppressivums beobachteten, zeigten Gioulou (51) und Rigby (145) eine nur geringe oder keine nachweisbare NK-Aktivitäts-Depression unter CsA-Therapie im Vergleich zu massiven Veränderungen unter konventioneller Therapie auf. Durch Azathioprin in Kombination mit Prednisolon wurde sowohl die NK-Zell-Funktion als auch die Effektorzell-vermittelte ADCC-Funktion sowie gleichzeitig die IL 2 und Interferon-Produktion unterdrückt (39, 51); unter CsA blieb dagegen die K-Zell-Funktion normal. Interessanterweise konnten diese in vivo supprimierten Lymphozyten nach in vitro-Inkubation mit Interferon wiederum zur NK- und K-Zell-Aktivierung stimuliert werden (51). Andere Autoren ermittelten zwar eine quantitative Reduktion von NK-Zellen unter CsA-Immunsuppression, die funktionelle NK-Aktivität blieb dagegen unbeeinflusst (143). Diese Befunde wurden mit einer geringeren Virusinfektions-Inzidenz bei CsA-behandelten Patienten in Zusammenhang gebracht (39, 143).

Sehr unterschiedliche Befunde ergab die Untersuchung der fraglichen NK-Zell-Beteiligung am zellulären Abstoßungsmechanismus. Ellis (40) und Waltzer (1981, 182) lehnten einen NK- und K-Zell-Effekt bei Abstoßungsphänomenen ab und wiesen deren Aktivitäts-Messung als wertlose Monitoring-Parameter aus. Auch Gastl konnte keinen signifikanten Unterschied der LGL-Zahl und NK-Aktivität bei Anwesenheit oder Fehlen einer Abstoßungskrise beobachten (47). In unseren Ergebnissen zeigten die LGL-Zahlen im peripheren Blut (P.B. und NK) während zellulärer Transplantatreaktion (ZTR) sowohl in Bezug zur gesamt-leukozytären als auch zur lymphozytären Zellpopulation keine quantitative Veränderung. Im Transplantat dagegen stiegen die LGL in Relation zur Höhe des zellulären Infiltrats bei ZTR an; anteilmäßig an der Lymphozyten-Gesamtpopulation blieben sie jedoch im Normniveau (durchschnittlich bis zu 11 %). Die NK-Zellen sind somit im kombinierten FNA- und Blut-Monitoring keine hilfreichen abstoßungsspezifischen Parameter, da sie im Rahmen der allgemeinen Hyperzellularität unspezifisch zunehmen. Von diagnostischer Wertigkeit ist nach wie vor eine hohe insitu-Inflammation von immunkompetenten Zellen und deren spezifisch-aktivierten Zellstufen. Im Gegensatz zu den o.e. Literaturstellen beschrieben einige Autoren bei Abstoßungsprozessen eine aktivierte NK-Zell-Funktion in Verbindung mit gesteigerter Interleukin- und Interferon-Produktion (51, 112). Waltzer (181) erklärte diese diversen Befunde in Ermangelung eines standardisierten Einzeltests für die in-vitro-Erfassung der NK-Aktivität. Häyry (63) und Nemlander (122) studierten tierexperimentell die spezifische Rolle der NK-Zellen im abstoßungsbedingten Reaktionsablauf bei keiner Immunsuppression. Die LGL weisen am 2. - 4. Tag - d.h. in der Frühphase der immunologischen AR - einen starken Influx ins Transplantat auf. Ihr Auftreten ist mit einer Steigerung

der NK- und K-Aktivität in situ assoziiert und von einer NK-Zell-Entleerung aus der Milz begleitet. Während sich die NK- und ADCC-Aktivität nach kurzer Zeit wieder abschwächt, erscheinen in zunehmendem Maße cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) im Transplantat; gleichzeitig ist wieder eine Zunahme der NK-Aktivität in der Milz zu verzeichnen. In diesem Zusammenhang wurde eine mögliche Prekursorzellfunktion der NK-Zellen im Reifungsprozeß der CTL diskutiert.

Hancock konnte eine ähnliche Frühphasen-Beteiligung der LGL anhand von Biopsien während AR nachweisen (74). Am 2. - 3. Tag stiegen die HNK-1 positiven Zellen im Bereich des vaskulären Endotheliums signifikant an und sackten bis zum 10. Tag wieder etwas unter die Norm ab. Da nur sehr wenig Immunglobulin an den Zelloberflächen nachgewiesen werden konnte, schrieb Hancock diese frühe inflammatorische Funktion hauptsächlich den NK-Zellen zu. Diese kurzzeitigen präinflammatorischen NK-Zellfluktuationen könnten durch ein sehr engmaschiges FNB-Monitoring aufgedeckt und deren offensichtliche Vermittlerrolle im immunologischen Abwehrmechanismus genauer differenziert werden. Über eine NK-Zell-Beteiligung bei Abstoßungskrisen nach Herztransplantation konnte Marboe (114) berichten.

Das Langzeitüberleben der Transplantate wurde in einigen Literaturangaben mit dem Wiederaufbau der NK-Aktivität assoziiert (44, 182). Während Helfer-Zellen, absolute T-Ly-Level und die 4/8 Ratio (zu Gunsten der Suppressor-Population) im Vergleich zu Kontrollen signifikant erniedrigt waren, wiesen die Leu 7 markierten LGL in der Spätphase eine signifikante Erhöhung auf.

Während großteils in der Literatur und auch in unseren Ergebnissen der LGL- bzw. der NK-Aktivitätserfassung keine abstoßungsspezifische, diagnostische Wertigkeit zugewiesen wurde, so bewährte sich das LGL-Monitoring als zuverlässiger Parameter in der Differentialdiagnose - Abstoßungsreaktion oder Virusinfektion - in der Frühphase des Überwachungszeitraumes nach Transplantation. Die im Rahmen der klinischen Organtransplantation verwandten immunsuppressiven Verfahren führen zu einer nicht-antigen-spezifischen Verminderung der immunologischen Reaktivität. Neben der erwünschten Unterdrückung der Transplantatabstoßung wird eine Herabsetzung der Infektoresistenz mit dem gesteigerten Risiko an bakteriellen, viralen oder Pilz-Superinfektionen induziert. Die Virusinfektionen der Herpesgruppe sind durch ihre therapieabhängige Problematik charakterisiert und stellen die primäre Morbiditätsursache nach Transplantation dar. HSV und VZV zeigen eine Affinität zu Haut und Mukosa; CMV und EBV dagegen haben primär systemische Wirkung (85, 149).

Die klinische Variationsbreite reicht vom asymptomatischen Verlauf über Fieberschübe, Arthralgien, Stomatitis und Pneumonie begleiteten Infektionen bis hin zu massiven septischen Krankheitsbildern (5). Die Verschlechterung der Transplantatfunktion im Sinne einer Virus-assoziierten Begleitnephritis in Kombination mit klinischer, unspezifischer Symptomatik kann gleichzeitig akzelerierte therapiebedürftige Abstoßungsreaktionen verschleiern; bzw. vice versa das klinische Bild einer letztlich "therapierefraktären" AR vortäuschen. Die Möglichkeiten zum sicheren Erregernachweis bestehen in zeitaufwendigen Methoden, wie Virusisolierung und Verlaufsbeobachtung pathologischer Virus-Titer-Anstiege. Durch Immunfluoreszenztechnik zum Nachweis von IgM-Antikör-

pern gelingt die Diagnose von frischen Virusinfektionen (5).

Bei 60 - 90 % der transplantierten, konventionell immunsupprimierten Patienten kommen Virusinfektionen mit variabler klinischer Penetranz vor. Naraqi (120) untersuchte in einer prospektiven Studie das Vorkommen der verantwortlichen Herpesviren und fand innerhalb der ersten 3 postoperativen Monate mit über 70 % das CMV als häufigstes auslösendes Agens, gefolgt von HSV (50 %), EBV (30 %), VZV (7 %) und Hepatitis B-Virus (13 %). In unserem virusinfizierten Patientenkollektiv traten generell klinisch relevante Infektionen seltener auf, wobei die CMV-Infektion mit Abstand am häufigsten (71 %) vertreten war; in weitaus geringerem Maße wurden pathologische HSV- und EBV-Titer-Anstiege registriert (s. Tab. 5). Eine Abnahme der Inzidenz und des Schweregrades von CMV-Infektionen unter Cyclosporin A in Kombination mit "low dose" Steroid-Therapie wurde bereits mehrmals berichtet (9, 30, 131). Dieses Phänomen wurde in der Literatur mit der selektiven immunsuppressiven Aktivität von CsA auf Helfer-T-Zellen und Interleukin 2 Freisetzung ohne Einfluß auf andere Subpopulationen mit spezieller antiviraler, bakterieller und fungizider Funktion erklärt (5). Das würde bedeuten, daß unter CsA die unspezifische Immunabwehr, resp. die funktionelle NK-Aktivität nicht, bzw. kaum unterdrückt wird (39, 143). Kurtz et al. fanden dagegen in ihrem Transplantations-Patientenkollektiv keinen Unterschied in der Infektionsrate zwischen konventioneller und CsA-Therapie (106).

Im Rahmen der Virusinfektions-Diagnose bietet gerade die Histologie keine ausreichenden spezifischen Befunde. In geschwollenen Tubulusepithelien sind basophile Einschlüßkörper und ein perifokales lympho-plasma-zelluläres In-

filtrat sichtbar (103). Dieser Befund ermöglicht keine Differenzierung zu abstoßungsinduzierten Infiltraten. Die infektiionsbedingte Begleitnephritis ist als unspezifische Glomerulopathie charakterisiert (9, 127, 153).

Als spezifische Virus-Parameter dagegen gelten die in unserer Studie parallel untersuchten und nachgewiesenen T-Lymphozytensubpopulations-Fluktuationen. Schooley et al. (153) konnten alle primären und sekundären Herpesvirusinfektionen in den ersten 3 postoperativen Monaten mit einer gleichzeitig persistierenden Umkehr des T 4/8 (Helfer/Suppressor T-Zellen) Verhältnisses kleiner 1 korrelieren. In der Literatur wird dieses virusspezifische Phänomen in vielen Studien bestätigt (17, 28, 29, 35, 47, 52, 110, 142, 159).

Unsere Ergebnisse bewiesen im Rahmen der FNA- und Blut-Diagnostik eine NK-Zell-Reaktion während Virusinfektion als zusätzlichen diagnostischen bzw. speziell differential-diagnostischen Parameter. Unter Infektionsbedingungen war eine signifikant erhöhte LGL-Infiltration im Transplantat, wie auch gleichzeitig im peripheren Blut zu verzeichnen. LGL waren sowohl in Relation zur Gesamt-Leukozytenzahl als auch bezeichnenderweise in Relation zur Gesamt-Lymphozytenpopulation um das Mehrfache angestiegen. Gerade in der Differentialdiagnose AR und Virusinfektion kann durch das LGL-Monitoring die in beiden Fällen charakteristische Hyperzellularität differenziert werden. Außerdem konnte die virusspezifische NK-Zell-Infiltration in situ unabhängig vom Grad der zellulären Transplantatreaktion nachgewiesen werden. Während abstoßungsbedingte, inflammatorische Prozesse im Transplantat ablaufen, bleiben parallel dazu die Lymphozytenwerte bzw. LGL-Werte in der Blutprobe auf normalem Niveau.

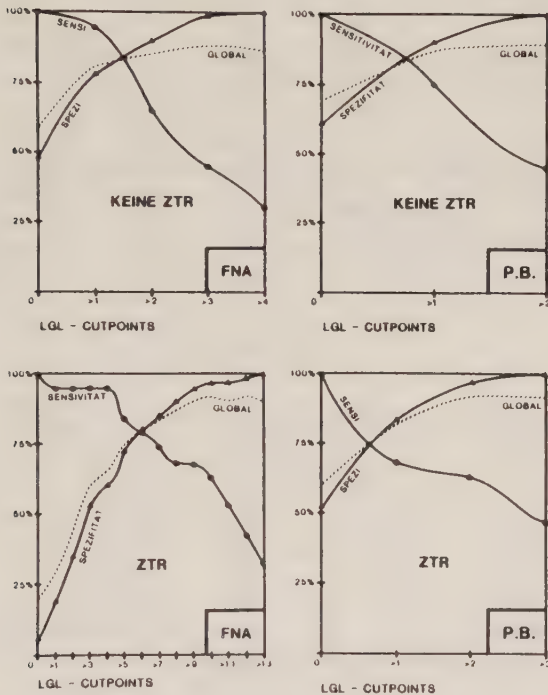
Bei Virusinfektion hingegen zirkulieren vermehrt NK-Zellen im Blut bei gleichzeitig erhöhtem Influx ins Transplantat. Dieses Phänomen konnte genauer an Patientenverläufen untersucht werden (Abb. 11, 12, 13).

Besteht ein abstoßungsspezifisch erhöhtes Corrected Inkrement bei gleichzeitig geringer LGL-Infiltration im Aspirat, eine unauffällige Blutprobe und normales Ly-Subpopulationsverhältnis, so spricht dies primär für eine inflammatorische, gegen das Transplantat gerichtete Reaktion. Ergibt sich aus massiver, zellulärer Infiltration unter hoher LGL-Beteiligung im Transplantat und im peripheren Blut kein oder nur ein mäßig erhöhtes C.I. bei gleichzeitiger Umkehr des T 4/8 Ly-Subset-Verhältnisses, so weist dies in erster Linie auf eine virusbedingte Immunantwort hin. Kann in Verbindung mit T 4/8 Umkehr kleiner 1 trotz massiver lymphozytärer, monozytärer und NK-Zell-Inflammation im Transplantat und peripheren Blut ein hohes C.I. errechnet werden, gefährden Abstoßung und Virusinfekt gleichzeitig das Transplantat.

Zur Bestimmung der Validität des NK-Zell-Zuwachses bezüglich Sensitivität, Spezifität und Vorhersagerichtigkeit wurden die Ergebnisse aus FNA und peripherem Blut nach dem Prinzip der 4-Felder-Tafel untersucht. Diese Analyse diente dem Vergleich zweier aus Häufigkeiten ermittelter (LGL-Anstieg) relativer Häufigkeiten (Virus ja/nein). Die errechneten Werte der Sensitivität, Spezifität und der daraus resultierenden Globalwertigkeit wurden bezüglich variabler LGL-"cutpoints" graphisch aufgetragen (Abb. 26, 27, 28). Die Wahrscheinlichkeit einer Virusinfektion bei gleichzeitiger zellulärer Transplantatreaktion liegt mit einer 75 %igen Sensitivität, resp. Spezifität vor, wenn mehr als 6 LGL im Aspirat und mehr

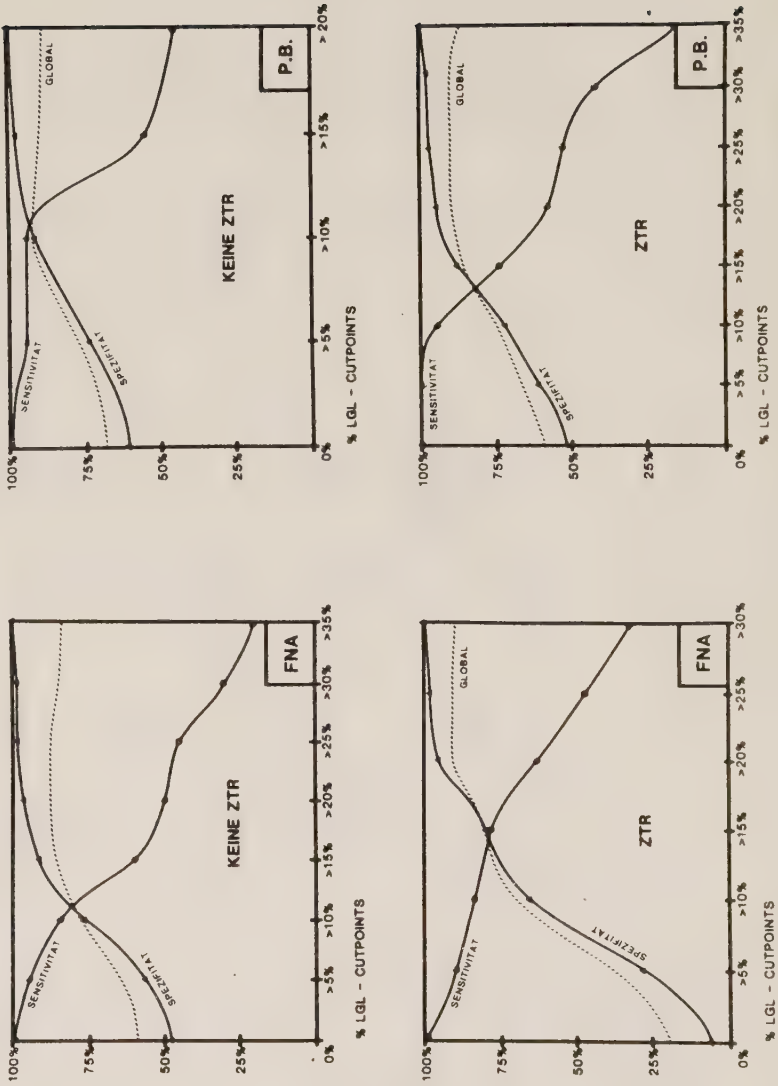
als 1 LGL in der korrespondierenden peripheren Blutprobe pro 100 Leukozyten vorkommen (Abb. 26).

Abb. 26: Nach Vierfelderschema ermittelte Sensitivität und Spezifität analog zu variablen LGL-"cut-points" (LGL/100 Leukos) im Feinnadelaspirat und peripheren Blut in Anwesenheit oder Fehlen von zellulärer Transplantatreaktion



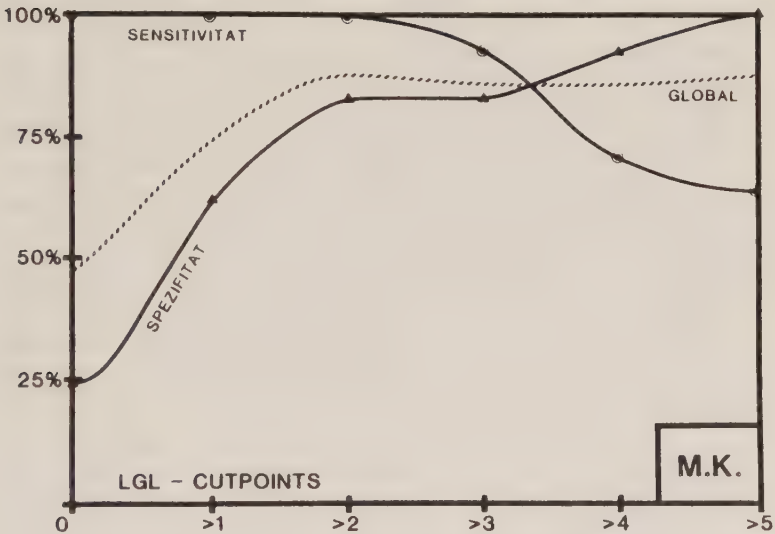
Während keiner zellulären Inflammation repräsentieren dagegen schon mehr als 4 LGL im Aspirat und mehr als 2 LGL im peripheren Blut pro 100 Leukos eine Virus-Spezifität von 100 %. Analog dazu entspricht dem "cutpoint" - LGL-Anteil innerhalb der Lymphozytenpopulation - größer

Abb. 27: Sensibilität und Spezifität (nach Vierfelder-Tafel errechnet), entsprechend LGL/Ly %-Satz im FNA und peripheren Blut



als 15 % während ZTR eine 75 %ige Sensitivität/Spezifität. Sind mehr als 30 % der Ly-Population NK-Zellen, errechnet sich bei geringerer Test-Sensitivität jedoch eine Spezifität von nahezu 100 % (Abb. 27). Ein NK-Zell-Influx von mehr als 5 LGL pro 100 mononukleäre Zellen (im M.K.) im Blut kann lt. statistischer Wahrscheinlichkeitsprüfung als hochgradig virusverdächtig angesehen werden (Abb. 28).

Abb. 28: Ermittelte Sensitivität und Spezifität zu variablen LGL-"outpoints" (LGL/100 mononukleäre Zellen) im Mononukleären Konzentrat



Nach den gleichen Richtlinien erfolgt die Differentialdiagnose Abstoßung, Virusinfektion und Bakterien/Pilz-Infektion im zytoimmunologischen Monitoring (ZIM) nach Herztransplantation (110, 136). Mehr als 15 % LGL im mononukleären Konzentrat und ein T 4/8 Quotient kleiner 1

gelten als spezifische Kriterien für Virusinfektion. Im Gegensatz dazu beschrieb Smith (157) keine unterschiedliche Virusinzidenz bei Patienten mit und ohne T 4/8 Inversion, d.h. die Mehrzahl der Patienten mit CMV-Infekt zeigten keine Umkehr.

Das in unseren Untersuchungen vor dem serologischen Virusnachweis auftretende Phänomen der T 4/8 Umkehr und der damit korrelierte NK-Zell-Zuwachs kann durch die Studie von Brando (17) belegt werden. Bei primären CMV-Infektionen geht die T 4/8 Inversion dem Auftreten von spezifischen IgM Antikörpern 6 - 10 Tage voraus. Eine virusbedingte Steigerung der NK-Aktivität im Sinne einer Eindämmung der Virusausbreitung noch vor der Zunahme der Suppressor-T-Zellen (bzw. Abnahme der T 4-Zellen) wurde aufgrund von tierexperimentiellen Untersuchungen von Quinnan (133, 134) postuliert. Einer Aktivierung der NK-Zell-Funktion in der akuten Infektionsphase folgt innerhalb einer Woche die T-Zell-Antwort (cytotoxische/suppressor T-Zellen-Proliferation), während gleichzeitig die NK-Zellen die virusinfizierten Targetzellen "killen". Nach 8 - 10 Tagen treten erst die Serumantikörper auf, bzw. ist das ADCC-System aktiv; letzteres persistiert noch lange und kontrolliert die Chronizität und Persistenz der Infektion.

NK-Zellen bzw. LGL agieren somit als primäre cytotoxische Zelleinheit im Abwehrmechanismus gegen Virusinfektion (36, 86). Habu (53) beschrieb in diesem Zusammenhang eine drastische Verkürzung der Überlebensrate von virusinfizierten Mäusen bei aufgehobener NK-Zell-Aktivität.

Waltzer (181) fand im Gegensatz zu bakteriellen Infekten keinen virusspezifischen Effekt auf NK-Zell-Aktivität.

Die virusinduzierte Immunkontrolle erfordert einen kombinierten Effekt von zellulärer und humoraler Immunität. Die Population der Effektorzellen, die sogenannten Vermittler der virusspezifischen-cytotoxischen Reaktion, rekrutieren sich aus cytotoxischen T-Zellen, ADCC-assoziierten K-Zellen, aktivierten Makrophagen und NK-Zellen (27, 48, 148). Die virusspezifische Immunantwort wird als nicht schädlich für das Transplantat, eher als Schutzfaktor angesehen. Da eine Virusinfektion nachgewiesenermaßen selbst eine depressive Wirkung auf die generelle Immunreaktion besitzt, ist das Überstehen bzw. die Abwehr einer Infektion vom Wiederaufbau der zellulären Immunität abhängig (27, 148).

Als antivirales Agens in der zell-vermittelten Immunregulation fungiert Interferon (36). IFN-Produktion von NK-Zellen beim Kontakt mit K 562-Target-Zellen wurde von Timonen (174) beschrieben. Nach Virusinkubation ist neben einer IFN-Produktion auch eine Steigerung der NK-Aktivität in der LGL-Population meßbar (36). Eine exogene Prophylaxe mit α -IFN soll die Manifestation von CMV und EBV nach Transplantation reduzieren. Die Wirkung von Interferon-Therapie auf menschliche Leukozyten besteht in einer Verzögerung des Beginns der Virus-Ausscheidung, einer verminderten Viämie-Inzidenz, einer verminderten Inzidenz von Virus-assoziierten Syndromen und in einer Herabsetzung des Reaktivierungsrisikos in CMV-seropositiven Patienten (31, 84). Während eine in-vitro-IFN-Applikation eine Steigerung der NK-Aktivität bewirkt, wurde anhand von in-vivo-Untersuchungen eine paradoxe Wirkung im Sinne von Stimulation und Hemmung berichtet (36, 89). Eine chronische IFN-Gabe soll sogar die NK-Zell-Aktivierung unterdrücken (94).

Die nicht ersetzbare Funktion der NK-Zellen als unspezi-

fische Faktoren im gesamten Immunregulationsprozeß wird durch die Studie von Charpentier (27) unter Beweis gestellt; eine stark erniedrigte NK-Aktivität bei Patienten nach Knochenmarks- und Nierentransplantation ist mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität durch das Cytomegalie-Virus assoziiert. Besitzt der Patient bei Infektionsbeginn eine gute primäre NK-Funktion, d.h. er kann eine CMV-spezifische cytotoxische Abwehr aufbauen, so wird die Infektionsperiode gut überstanden.

3.1 Akutes Nierenversagen bzw. akute Tubulusnekrose im postoperativen Monitoring

Das unmittelbar postoperativ auftretende akute Nierenversagen (ANV) stellt auch nach langjähriger Transplantationserfahrung noch immer eine der Hauptkomplikationen nach Nierentransplantation dar. Die ANV-Problematik ist durch diagnostische, speziell differentialdiagnostische und konsekutiv therapeutische Schwierigkeiten charakterisiert. Die postoperative Oligo-Anurie-Phase mit erhöhten Retentionswerten erfordert befristete Hämodialyse-Behandlung bis zur Wiederaufnahme der Transplantatfunktion. Speziell unter CSA-Therapie setzt die Normalisierung der Nierenfunktion vergleichsweise später und langsamer ein (107, 147). In dieser oft mehrere Wochen dauernden ANV-Phase verlieren Serumkreatininkonzentration und Ausscheidung als klinische Parameter für Abstoßungsreaktionen und Nephrotoxizität an diagnostischer Bedeutung. Bisher wurde eine ANV-Ausschluß-Diagnose aufgrund von Abwesenheit eindeutiger in-situ-Inflammation in Kombination mit morphologischen Veränderungen gestellt (24, 57).

ANV kann sich bereits intraoperativ manifestieren: nach primär guter Füllung zeichnet sich innerhalb weniger Minuten eine Abnahme der Konsistenz und des Gewebsturgors ab, die Diurese kommt nicht in Gang bzw. sistiert nach kurzem und setzt sich in tagelanger Anurie fort (147). Als Ursache für dieses primäre Nierenversagen nach Transplantation wird ein Ischämieschaden aufgrund einer maximal bis zu 48 Stunden dauernden Konservierungszeit verantwortlich gemacht.

Neue Untersuchungen am Transplantationszentrum München ergaben einen Zusammenhang zwischen der Länge der kalten Ischämiezeit und der davon beeinflussten Inzidenz für ANV unabhängig von der Wahl des Immunsuppressivums (82, 155). Während bei kurzfristiger Ischämie nur 25 % der Patienten ANV aufwiesen, steigerte sich die ANV-Rate bei einer 36stündigen Ischämie auf bis zu 82 %. Opelz beschrieb die Entwicklung schlechter postoperativer Transplantatfunktion bei einem Überschreiten der warmen Ischämiezeit von mehr als 30 Minuten bzw. der kalten Ischämiezeit von mehr als 48 Stunden, gleichfalls unabhängig von Immunsuppression. Außerdem wurde eine höhere Transplantatüberlebensrate unter CsA-Therapie im Vergleich zu konventioneller Therapie nur unter der Voraussetzung beobachtet, daß die kalte Ischämiezeit von 36 Stunden nicht überschritten wurde (123). Hillebrand und Siebert berichteten unter CsA-Therapie in bezug auf das 1-Jahres-Transplantatüberleben bei ANV von einer 67 %igen gegenüber einer 82 %igen Rate bei primär gutfunktionierenden Organen. Als Ursache wird ein möglicherweise kombinierter bzw. additiver Effekt durch gleichzeitiges Vorkommen von Ischämieschäden und CsA-Nephrotoxizität diskutiert (82, 155).

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß unter CsA-

Therapie eine möglichst kurze, weniger als 30 Stunden dauernde Konservierungszeit angestrebt werden sollte; in der Praxis zeigen sich jedoch genau gegensätzliche Tendenzen. Aufgrund des zunehmenden Organbedarfs, d.h. durch zunehmende Organspende aus entfernteren "Spender"-Kliniken entstehen längere Ischämiezeiten zwischen Ex- und Implantation.

Als morphologisches Korrelat zur eingeschränkten Nierenfunktion tritt die akute Tubulusnekrose in Erscheinung. Die ischämische Schädigung manifestiert sich primär an den tubulären Strukturen (55, 57, 103). Unter ATN-Bedingungen treten kaum inflammatorische Infiltrationszellen, jedoch Gewebsmakrophagen - im Sinne einer Abräumreaktion nekrotischen Gewebes - auf (147). Interessanterweise gibt es keinen Hinweis, daß unter Abstoßungsbedingungen interstitielle Infiltratzellen auf direktem Wege Parenchymzellen zerstören können. Die tubuläre Basalmembran soll den direkten Zellkontakt verhindern (111). Zusätzlich konnte Häyry zeigen, daß Infiltratzellen nach Elution *in vitro* keine lytische Aktivität gegenüber glomerulären oder tubulären Zellen aufweisen (55). Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgern, daß in der frühen postoperativen Phase für Gewebszellalterationen zumindest nicht primär Abstoßungs-Prozesse, sondern eher ischämische Einflüsse - nephrotoxische Schädigung ausgeschlossen - verantwortlich sind. Unter prolongierten Abstoßungsbedingungen jedoch verschlechtert sich die NGZ-Morphologie bis hin zu irreversibler Transplantatschädigung mit im FNA sichtbarem Zelluntergang (64).

In unseren Ergebnissen wiesen die Tubuluszellen des proximalen und distalen Konvoluts unter konventioneller Therapie gehäuft zytoplasmatische und nukleäre Schädigung

auf. Im Vergleich dazu zeigen die CsA-Befunde in therapeutischen Blutspiegelbereichen eine geringere Inzidenz zu Zellschwellung und -vakuolisierung. Zytoplasmatische Einschlüsse traten gleich häufig, jedoch nur in wenigen Tubuluszellen auf. Vermehrtes Auftreten von tubulären und Endothelverbänden sowie azurophiler Granulationen während akuter Tubulusnekrose (57, 147) konnten wir nicht beobachten. Häyry korrelierte das Ausmaß der TZ-Vakuolisierung mit der Schwere der "klinischen ATN" (57), resp. das Verschwinden morphologischer Erscheinungen steht in engem Zusammenhang mit Nierenfunktions-Verbesserung (64). Irreversibler Schaden drückte sich in Zellpyknose und Zellnekrose aus (61, 72). Im Gegensatz dazu wurden an Endothel-Strukturen keine markanten Veränderungen während ATN registriert.

Bei der Erfassung ATN-spezifischer Veränderungen zeigte der Vergleich von Stanzbiopsie und FNAC eine Übereinstimmung in 60 %; in 32 % waren nur die aspirierten Parenchymzellen ATN-positiv, d.h. Zellen mit ischämischer Vakuolisierung und TZ-Nekrosen (34). Die FNB scheint somit eine sensiblere Methode zur Indikation tubulärer Schädigung zu sein. Interessanterweise verschwanden bei Normalisierung der Transplantatfunktion die geschädigten TZ aus dem FNA; dafür traten vereinzelt TZ-Regenerationszeichen, wie atypisch mehrkernige und in Mitose befindliche TZ auf.

Diese Ergebnisse rechtfertigen die Auswahl der ATN als Vergleichskriterium zur Untersuchung Azathioprin- bzw. Cyclosporin-A-spezifischer, morphologischer Veränderungen an den aspirierten Parenchymzellen. Um alleinige nephrotoxische CsA-Effekte in der postoperativen Phase aufzudecken, war es notwendig, ATN in beiden Vergleichsgruppen vorauszusetzen. Zusätzliche überlappende Effekte

durch zelluläre Reaktionen konnten somit gleichzeitig untersucht werden.

3.2 Cyclosporin-A-assoziierte Nephrotoxizität Klinik, Feinnadelaspirationszytologie- und Histologiebefunde

Trotz bedeutender und hauptsächlich durch den Einsatz von Cyclosporin A (CsA) erzielter Fortschritte in der Nierentransplantation bleibt ein großes therapeutisches Problem bestehen:

Die "Untersuppression" als Konsequenz der Rücksichtnahme auf medikamentös-toxische Nebenwirkungen birgt die Gefahr einer aufflammenden Abstoßungsreaktion. Die "Übersuppression" erhöht das Risiko der infektiösen Komplikationen (21) und nephrotoxischen Effekte auf Gewebe und Funktion des Transplantats. Eine optimale therapeutische Einstellung zur Vermeidung extremer Schwankungen erfordert sensible Testverfahren und standardisierte diagnostische Kriterien zur Erfassung immunologischer Vorgänge und immunsuppressionsbedingter Einflüsse.

Die ersten Ergebnisse über die klinische Anwendung des neuen hochpotenten Immunsuppressivums Cyclosporin-A berichteten Calne et al. 1978 (21, 23). Die anfängliche Euphorie wurde durch die Diskussion über verschiedenartige Nebenwirkungen inzwischen etwas gedämpft. Die beschriebene Nephro- und Hepatotoxizität manifestierte sich klinisch in einer Verschlechterung der Nierenfunktion, Anstieg der Retentionswerte (7, 62), des Serum-bilirubins, der alkalischen Phosphatase, z.T. auch der

Transaminasen (5) und Hypertension. Damals wurde ein reversibler Toxizitätseffekt ohne morphologisches Korrelat diskutiert. Zu den primär harmloseren CsA-Nebenwirkungen zählen Hirsutismus, Gingivahypertrophie, atypisches Nagelwachstum und Hautverdickung, gastrointestinale Beschwerden, Tremor und psychische Alteration (5, 68, 107). CsA wirkt bevorzugt auf proliferierende Immunzellen; zeigt dagegen keinen hemmenden Einfluß auf das unspezifische Abwehrsystem, auf andere proliferative Zellsysteme oder auf Knochenmark-Stammzellen. Das Fehlen einer myelotoxischen Wirkung stellt einen großen Vorteil gegenüber Azathioprin dar (5, 8). B. Ryffel untersuchte tierexperimentell die akuten, subakuten und Langzeit-Toxizitätseffekte von CsA (150).

Embryonale und fetale Toxizität trat nur bei gleichzeitig toxischen Dosen beim Muttertier auf. Weder teratogener noch carcinogener Effekt konnte in Tierstudien nachgewiesen werden. Thiru et al. beschrieben in CsA-immunsupprimierten Transplantatempfängern Entwicklung von Lymphomen (167), deren Inzidenz konnte nicht eindeutig auf CsA zurückgeführt werden, da mehrere Immunsuppressiva gleichzeitig verabreicht wurden. Aus der o.g. Tierstudie resultiert eine sichere Schwellendosis von 30 mg/kg CsA pro Tag; bei dieser bis zu fünffach höher als beim Menschen angewandten Dosis zeigte sich noch keine nephrotoxische Wirkung bei der Ratte (150).

Mehrere Autoren postulieren eine dosisabhängige, bei Dosisreduktion reversible Nephrotoxizität (97, 103, 169, 188). Bis zu 2/3 der Patienten weisen eine toxizitätsbedingte Organfunktions-Verschlechterung auf (107). Thiru berichtete aus einer Immunsuppressiva-Vergleichsstudie von einem signifikant erhöhten Serumkreatininlevel bzw.

erniedrigten Kreatinin-Clearance-Wert unter postoperativer CsA-Behandlung (169). Ein CsA-assoziiierter nephrotoxischer Effekt mit Nierenfunktionseinbuße wurde nicht nur bei nierentransplantierten Patienten, sondern auch durch hohe CsA-Dosen nach Herztransplantation (118) und CsA-Therapie von Autoimmunerkrankungen ohne primäre Nierenbeteiligung (83) verursacht. Interessanterweise läuft die Verstoffwechslung von CsA größtenteils in der Leber ab und nur 6 % der CsA-Metaboliten werden durch den Urin ausgeschieden (14). Die toxische Wirkung auf die Ausscheidungsfunktion könnte auf der von Ryffel tierexperimentell nachgewiesenen CsA-Akkumulation in Haut-, Fett- und Lebergewebe sowie im Nierenparenchym beruhen (150).

Da bisher histologische und morphologische Kriterien noch ungenügend die verschiedenen Manifestationsformen der CsA-Toxizität erfassen, wurden diese klinisch klassifiziert (132). Seit die Möglichkeit zur radioimmunologischen Messung von CsA-Blutspiegeln besteht (37), wurde vielerorts ein Zusammenhang zwischen Schweregrad der toxischen Ausprägung und Höhe der CsA-Blutkonzentration beobachtet (12, 83, 88, 87, 91, 97, 188) und die Dosierung danach ausgerichtet (98, 132); der therapeutische Bereich ist durch Blutlevel zwischen 150 und 600 ng CsA/ml charakterisiert (132). Der Nachteil der CsA-Plasmakonzentrations-Bestimmung mittels Radioimmunoassay liegt in der Kreuzreaktion mit CsA-Metaboliten, die fälschlicherweise die gemessenen CsA-Spiegel erhöhen. Differenziertere Spezifität ermöglichen chromatographische Methoden (HPLC) (37).

Mehrere Studien verglichen zur histologischen Erfassung von CsA-Nephrotoxizität die Gewebefunde mit der Höhe der CsA-Blutkonzentration (12, 83, 117, 166, 188). Auch in

unseren Ergebnissen bewerteten wir die cytomorphologischen Veränderungen am Feinnadelaspirat entsprechend dem - zum Biopsiezeitpunkt relevanten - CsA-Blutspiegelbereich.

In der Aspirationszytologie traten neben Schwellung und inhomogener Vakuolisierung auch zytoplasmatische Zelleinschlüsse, Granulationen und speziell, auch von P. Häyry beschriebene (57, 64), Auto-Erythrophagozytose in den Tubuluszellen in Relation zur CsA-Blutspiegelhöhe gehäuft auf. Im Vergleich dazu beobachteten Mihatsch und andere Autoren (96, 116, 117, 154, 168) in nahezu der Hälfte der Stanzbiopsien ein vermehrtes Aufkommen an Riesenmitochondrien, die lichtmikroskopisch als tubuläre Einschlusskörper imponierten (12). Deren Häufigkeit in Kombination mit tubulärer Vakuolisierung wurde mit signifikant erhöhtem CsA-Serumlevel in Zusammenhang gebracht (117). Auch Ryffel beschrieb am Tiermodell unter toxischen CsA-Dosen das Auftreten von ultrastrukturellen Veränderungen an den Tubulusepithelien, wie Ausweitung des endoplasmatischen Retikulums und Zunahme an Lysosomen und Megamitochondrien (150). Andere Autoren bezweifelten eine CsA-spezifische Bedeutung der Riesenmitochondrien, da sie auch bei anderen Nierenerkrankungen ohne immunsuppressiven Einfluß vorkommen sollen (164). Des weiteren fand Mihatsch vermehrt eine typisch-isometrische Tubulusvakuolisierung in nahezu 50 % der Fälle (117). Licht- und Elektronenmikroskop zeigten gleichgroße, leere Vakuolen. Dieser histologische Befund differiert zu unseren aspirationscytologischen Beobachtungen einer inhomogenen Vakuolisierungsform. Den bei toxischen Blutspiegelkonzentrationen signifikant gehäuft auftretenden "Stanzloch-Vakuolen" konnte in der Literatur kein äquivalentes histologisches Korrelat zugeordnet werden. Die in der Stanzbiopsie und nach elektronen-

mikroskopischer Aufarbeitung nachgewiesene Häufung und Vergrößerung zytoplasmatischer Lysosomen (150, 154, 156) und deren eventuelle Alteration durch die Zytozentrifugen-Prozedur könnten das Zustandekommen von "Stanzloch-Vakuolen" im Aspirat möglicherweise erklären. In 60 % der Biopsien wurde Mikrokalzifizierung als Ausdruck von Einzelzellnekrosen in verschiedenen Nephronabschnitten entdeckt (117); im FNA konnten jedoch keine Calcium-Präzipitate nachgewiesen werden.

Im Rahmen eines Histologen-Workshops 1985 wurde das Auftreten von isometrischer Vakuolisierung, Mikrokalzifizierung und tubulären Einschlusskörpern bzw. Riesenmitochondrien als toxische Tubulopathie klassifiziert. Eine direkte subzelluläre Organellenschädigung der Tubuluszellen soll ursächlich dafür verantwortlich sein (12). Da Mikrokalk offensichtlich länger in der Biopsie sichtbar bleibt, könnten vermehrt auftretende Riesenmitochondrien in Kombination mit Tubuluszellvakuolisierung und interstitiellem Ödem als frische CsA-Schädigung interpretiert werden (117, 169). Als weiterer CsA-assoziiierter Toxizitätsindikator wurde die Arteriolopathie im Sinne einer vaskulären Läsion angesehen. Vaskulopathie-bedingte Endothelzell-Alterationen könnten neben ödematöser Schwellung, peritubulärer Kapillardilatation (12) und Endothelzelldegeneration (68) eine teilweise Ablösung der Gefäßwandzellen bewirken; die in unseren und Folgeuntersuchungen (34) berichtete hohe Endothelzell-Ausbeute im Aspirat unter CsA-Therapie könnte damit erklärt werden. Während unter CsA-Einfluß typischerweise Arteriolen geschädigt werden, manifestierten sich bewiesenermaßen die vaskulären Schäden der humoralen Abstoßung an den größeren Arterien (12). In histologischen Langzeitstudien konnte eine CsA-bedingte Zunahme an Arteriolopathie gegenüber der AZA-Vergleichsgruppe signifikant unterschied-

den werden (162); unter konventioneller Therapie häuften sich dagegen glomeruläre Veränderungen; bei CsA-Patienten wurde kein Glomerulumschaden beobachtet (68, 169). In bezug auf Häufigkeit und Schweregrad interstitieller Fibrose konnte in beiden Therapiegruppen kein Unterschied ermittelt werden (162). Farnsworth und Bohman sahen im Gegensatz dazu die diffuse Fibrose als Ausdruck einer CsA-assoziierten, toxischen Veränderung (42, 190). Im Vergleich dazu ist die FNAC-Methode nicht in der Lage, fibrotische Parenchymschäden zu erfassen.

Trotz umfangreicher Vorarbeiten und Auswertung der Vergleichsstudien konnte das Pathologengremium keine typischen pathologischen Befunde als CsA-spezifisch definieren. Die beschriebenen Morphologie-Parameter reflektieren mögliche toxische Gewebsmanifestationen (12).

Durch den immunofluoreszenztechnischen Einsatz eines gegen das CsA-Molekül gerichteten Antikörpers war es gelungen, CsA-Ablagerungen an aspirierten Parenchymzellen zu demonstrieren (187, 188). Durch lichtmikroskopische Immunperoxidase-Technik färbten sich vor allem antikörpermarkierte proximale Tubuluszellen an. Der Schweregrad der klinisch nephrotoxischen Ausprägung ist dosisunabhängig direkt mit der Menge des abgelagerten CsA korreliert, d.h. bei guter Organfunktion fluoreszieren die Tubuluszellen kaum. Eine intensive Zellfluoreszenz durch massive CsA-Ablagerungen korreliert gut mit klinischem Nephrotoxizitätsverdacht und pathologischer Gewebsmorphologie. Bei Dosisreduktion und klinischer Besserung verschwinden CsA-Antikörperdepots wieder aus dem Aspirat. E. Willebrand hat, basierend auf diesen Ergebnissen, alle hilfreichen Parameter zur Differentialdiagnose aufgelistet (Abb. 29).

Abb. 29: Differentialdiagnose bei Funktionsverschlechterung des Transplantats im postoperativen FNAC-Monitoring (nach E. Willebrand)

Kreatinin	F N A C			DD
	ZTR	TZ Schäden	CsA Ablage- rungen	
normal	-	+	+	gute Transplan- tatfunktion
↑	-	++	-	A T N
↑	-	+++	+++	CsA-Toxizität
↑	+	+	-	Abstoßung
↑	+	+++	+++	Abstoßung und CsA-Toxizität

Eine schwedische Arbeitsgruppe konnte eine 6- bis 7fach stärkere CsA-Akkumulation im Gewebe im Vergleich zu Plasmalevel unter normalen oder Abstoßungsbedingungen nachweisen (166). Eine "medium size"-Nadelbiopsie diente zur Gewinnung einer kleinen Nierengewebsprobe, um den CsA-Gehalt zu messen. Eine CsA-Gewebe/Plasma-Ratio war bei klinisch und histologisch eindeutiger Intoxikation 4fach gegenüber der Kontrolle erhöht.

Zwei weitere, nicht-invasive Alternativ-Methoden wurden noch im Rahmen der postoperativen Nephrotoxizitäts-Diagnose angewandt:

Exfoliative Urinzytologie liefert zwar wenig Information über immunologische Vorgänge im Transplantat, soll aber während Intoxikation CsA-typische granuliert TZ und zytologische Einschlüsse, epitheliale Fragmente und nekrotische TZ aufweisen (32). Unter AZA-Therapie wurden die urinzytologischen Befunde in dieser Ausprägung nie

beobachtet.

Als zweite, nicht-invasive Methode wurde 1985 von Feduska et al. (43) die "Magnetic Resonance Imaging"-Technik vorgestellt. Sie erlaubt eine Differenzierung zwischen AR und NT durch spezifisch unterschiedliche Impulsauslösung cordicomedullärer Grenzstrukturen und Schwellung im Parenchym.

Gerade die Differentialdiagnose: "chronische Abstoßungsreaktion und CsA-Späteffekt" in der Langzeitüberwachung bereitete Schwierigkeiten. Histologische Schnitte zeigten chronisch interstitielle Nephritis, diffuse Fibrose, tubuläre Atrophie und gleichzeitig milde interstitielle lymphozytäre und plasmazelluläre Infiltration (68, 169). Sind zusätzlich vaskuläre Schäden im Sinne humoraler Prozesse vorhanden, spricht dies für das Vorliegen einer chronischen Abstoßungsreaktion (169). Die FNB bietet hinsichtlich dieser Problematik keine hilfreichen Aufschlüsse. In den oft nur einmalig durchgeführten FNB in der Spätphase des Transplantationsmonitorings werden gleichfalls Infiltrate aus nicht aktivierten Lymphozyten neben mäßigem, schlecht differenzierbarem Parenchymschaden beobachtet. Sibley schlug umfangreiche differentialdiagnostische Methoden wie CsA-Bestimmung, subcapsuläre hydrostatische Druckmessung, Nierenszintigraphie und T-Zellsubpopulations-Bestimmung im peripheren Blut, Nierenbiopsie und FNB vor (154). Klintmalm fand keinen Unterschied in der Häufigkeit für Abstoßungsreaktion und Nephrotoxizität in den ersten postoperativen Monaten, dagegen sank bei Langzeitbeobachtungen die Inzidenz für chronische Abstoßungsformen zugunsten der CsA-Spätschäden (97). Im Rahmen der Differentialdiagnose spricht aus klinischen Gesichtspunkten für Abstoßung: Ausfuhr-rückgang, Gewichtszunahme, Körpertemperaturerhöhung und rascher Kreatininanstieg. CsA-Nephrotoxizität ist durch

"high-output failure" in Kombination mit langsamer Kreatininerhöhung charakterisiert. Dabei tritt kein Fieber und keine Inflammation in Erscheinung.

Zur Lösung des CsA-assoziierten Nephrotoxizitätsproblems könnten die Ergebnisse einer Vergleichsstudie von Hillebrand et al. (1986) beitragen (83). Eine drastisch reduzierte CsA-Dosis in Kombination mit AZA im Vergleich mit normal hoch dosierter Therapie senkte die CsA-Blutlevel um ca. die Hälfte und verminderte die Inzidenz für CsA-assoziierte Befunde, wie Vakuolisierung, Mikrokalk, Megamitochondrien, Arteriopathie und streifenförmige Fibrose. Klinisch manifestierte sich die Dosisreduktion weder in einer signifikanten Kreatininverschiebung, noch in Hinsicht auf ein gehäuftes ANV-Vorkommen. Interessanterweise trat innerhalb des niedrig-dosierten Patientenkollektivs keine akzelerierte chronische Abstoßungskrise auf. Ein paralleles FNA-Monitoring stand nicht zur Verfügung.

Früher wurden im Rahmen der CsA-Vollblutspiegel-Überwachung aus Furcht vor Abstoßungsreaktionen CsA-Konzentrationen im toxischen Bereich toleriert und damit auch klinische Toxizitätserscheinungen in Kauf genommen. In diese Beobachtungsphase fiel das Auftreten von typischen quantitativ und qualitativ erfaßbaren cytomorphologischen Gewebsveränderungen im Feinnadelaspirat. Seit der kontrollierten Einstellung auf therapeutisch vertretbare Blutspiegelkonzentrationen zwischen 300 und 600 ng/ml (162) wurden "Stanzloch-Vakuolen" in dieser Ausprägung kaum noch beobachtet.

Alle klinischen, laborchemischen, histologischen und cytomorphologischen Befunde führen zu der Schlußfolgerung, das immunsuppressive Regime mit der gerade noch immunologisch vertretbaren, niedrigsten CsA-Dosis anzustreben (83). Vielleicht kann auf pharmakologischer Basis zukünftig durch chemische Modifikation des CsA-Moleküls die Separation des immunsuppressiven vom toxischen Effekt gelingen (132) und damit ein weiterer Schritt zur Verbesserung der Transplantatüberlebensrate getan werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der Feinnadelaspirationszytologie und der ergänzenden zytologisch-immunologischen Blutdiagnostik wurden im Rahmen der postoperativen Untersuchungen nach Nierentransplantation cytomorphologische Veränderungen aufgrund von Virusinfektion und Cyclosporin A-induzierter Nephrotoxizität aufgedeckt.

Die Analyse der NK-Zell-Infiltration bei zellulärer Transplantatreaktion und Virusinfektion ergab folgende Ergebnisse:

- LGL infiltrierten das Transplantat während akuter zellulärer Reaktion in nahezu konstanter Relation zur Höhe der lymphozytären Inflammation und erreichten dabei im Mittel einen prozentualen Anteil von 5 - 11 %; d.h. sie zeigten keine abstoßungsspezifische Aktivitätssteigerung und profilierten nur unspezifisch im Rahmen der allgemeinen zellulären Transplantatreaktion. Im peripheren Blut dagegen blieb unter diesen Bedingungen die LGL-Zahl konstant niedrig.
- Während Virusinfektion war ein signifikant erhöhter NK-Zell-Zuwachs im Transplantat und gleichzeitig im peripheren Blut zu verzeichnen; bis zu maximal 40 % der immunkompetenten lymphozytären Infiltrationszellen wurden als LGL identifiziert.
- Der virusbedingte, signifikante LGL-Anstieg wurde auch unabhängig von der Höhe des zellulären Infiltrats beobachtet. Im Transplantat sowie im peripheren Blut nahm die NK-Zell-Population sowohl bei massiver abstoßungsbedingter Hyperzellularität als auch bei keiner zellulären Transplantatreaktion um das 3- bis 8fache zu.

- Die Korrelation von normalem T-Helfer/Suppressor-Zellverhältnis und virusspezifischer Umkehr ergab in bezug auf die Höhe der LGL-Infiltration unter Infektionsbedingungen keinen Unterschied.
- Im Rahmen der zytologisch-immunologischen Blutdiagnostik konnte während im Feinnadelaspirat sichtbarer, zellulärer Transplantatreaktion parallel im mononukleären Konzentrat keine Veränderung der NK-Zell-Population registriert werden. Unter Virusinfektion dagegen stieg die LGL-Population signifikant um das 5fache an. Pneumocystis carinii-Infektionen induzierten keine gesteigerte NK-Zell-Reaktion.
- Die Patientenverläufe wiesen die Vorteile eines kontinuierlichen, parallelen Monitoring-Programms mittels Feinnadelaspirationszytologie und zytologisch-immunologischer Blutdiagnostik hinsichtlich der Differentialdiagnose Abstoßungsreaktion und Virusinfektion auf.
- Die zeitliche Korrelation von virusspezifischer klinischer Symptomatik, Umkehr des T-Zell-Subpopulationsverhältnisses und mehrfacher NK-Zell-Anstieg mit serologischer Diagnostik ergab eine gute Übereinstimmung. Als sicherer Indikator zur Früherkennung von Virusinfektionen in der postoperativen Phase erwies sich die Verlaufskontrolle der LGL-Population und des Helfer-Killer-T-Zellverhältnisses im mononukleären Konzentrat.

Die Untersuchung der Cyclosporin-bedingten morphologischen Veränderungen an aspirierten Parenchymzellen während postoperativem Nierenversagens ergab folgende Befunde:

- Unter Cyclosporin A-Therapie war eine signifikant erhöhte Endothelzell-Ausbeute im Feinnadelaspirat zu ver-

zeichnen; im Vergleich zur konventionellen Immunsuppression stieg das Endothel/Tubuluszell-Verhältnis unabhängig vom Auftreten primären Nierenversagens, zellulärer Transplantatreaktion oder Virusinfektion durchschnittlich 20fach an.

- Die morphologische Differenzierung der Nierengewebszellschädigung während primärer Oligo-Anurie bzw. akuter Tubulusnekrose ergab unter Azathioprin-Behandlung ein einheitliches pathologisches Gewebsmuster an nukleären und zytoplasmatischen Alterationen. Cyclosporin A dagegen induzierte inhomogenere pathologische Veränderungen im Vergleich zu konventioneller Therapie.
- Die Korrelation der morphologischen Veränderungen zur Höhe der Cyclosporin-A-Blutkonzentration zeigte unter Nephrotoxizitätsbedingungen, d.h. bei Cyclosporin-A-Spiegel über 1000 ng/ml, ein signifikant gehäuftes Vorkommen von typischer Tubuluszellvakuolisierung. Die sogenannte "Stanzloch"-Vakuolisierung wurde in den Aspiraten unter Azathioprin nicht beobachtet und dürfte daher als CsA-assoziiierter nephrotoxischer Parameter gewertet werden. Zusätzlich traten gehäuft tubuläre intrazytoplasmatische Zelleinschlüsse und Erythrophagozytose in Relation zur Höhe des Cyclosporin-Blutspiegels auf.

Das Resümee aus diesen Ergebnissen unterstreicht die Wertigkeit der Feinnadelbiopsie in Kombination mit Aspirationszytologie und die zytologisch-immunologische Blutdiagnostik als diagnostische Parameter in der Patientenüberwachung nach Nierentransplantation. Die Kontrolle des NK-Zell-Anteils im Transplantatinfiltrat und im peripheren Blut erleichtert die Differentialdiagnose zwischen Abstoßungsreaktion und Virusinfektion. Das Vermei-

den toxischer Cyclosporin-A-Blutkonzentrationen schützt vor medikamentös induziertem Parenchymschaden, der in seiner Asprägung anhand von spezifischen Befunden in der Feinnadelbiopsie aufgedeckt werden kann.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Abo T., Balch C.M.
A Differentiation Antigen of Human NK and K Cells
Identified by Monoclonal Antibody (HNK-1)
J. Immunol. 127: 1024-1029 (1981)
- (2) Abo T., Cooper M.D., Balch C.M.
Characterization of Human NK Cells Identified by the
Monoclonal HNK-1 (Leu 7) Antibody
in: "NK-Cells and other Natural Effector-Cells", Ed.
Herberman R.B., Academic Press, Inc. New York: 31-38
(1982)
- (3) Albert E., Scholz S.
Das Haupthistokompatibilitätssystem (HLA) des Men-
schen: Serologie, Genetik, klinische Bedeutung
Immunforschung in Klinik und Labor, Fresenius Stif-
tung: 77-105 (1979)
- (4) Albert E.
Histokompatibilitätstestung und ihre klinische Rele-
vanz
in: Transplantationschirurgie, hrsg. von R. Pichlmayr,
Springer Verlag: 171-200 (1981)
- (5) Alexandre G.P.J., Wonigeit K., Bunzendahl H.
Immunsuppression
in: Transplantationschirurgie, hrsg. von R. Pichlmayr,
Springer Verlag: 212-228 u. 238-254 (1981)
- (6) Ax W.
Monoklonale Antikörper durch Lymphozyten-Hybridisierung
Laboratoriumsblätter 30, Behringwerke AG. 89-99 (1980)
- (7) Aznar J.B., Tilney N.
Cy-A: A More Specific Immunosuppressive Agent
J. Clin. Surg. Vol 1, No 1: 53-61 (1982)
- (8) Bach J.F.
The Mode of Action of Immunosuppressive Agents
Front. Biol. 41: 93-225 (1975)
- (9) Baldwin III W.M., Henny F.C., Gemert G.W. van, Claas
F.H.J., Westedt M.L., Paul L.C., Daha M.R., Es L.A. van
Distinctions Between Cytomegalovirus-Related Graft
Loss and Rejection
Transplant. Proc. Vol XVII, No 6: 2600-2603 (1985)

- (10) Begemann H.
Praktische Hämatologie
Thieme Verlag, 1982
- (11) Belitsky P., Gupta R., Campbell J.
Diagnosis by Fine Needle Aspiration Cytology
Transplant. Proc. Vol XVI: 1076-1079 (1984)
- (12) Bergstrand A., Bohman S.O., Farnsworth A., Gokel J.J.,
Krause P.H., Lang W., Mihatsch M.J., Oppedal B., Sell
S., Sibley R.K., Thiru S., Verani R., Wallace A.C.,
Zollinger H.U., Thiel G., Wonigeit K.
Renal Histopathology in Kidney Transplant Recipients
Immunosuppressed with Cyclosporin A: Results of an
International Workshop
Clin. Nephrol. Vol 24, No 3: 107-119 (1985)
- (13) Böyum A.
Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from
Human Blood
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 Suppl. 97: 77-89
(1968)
- (14) Borel J.F., Feurer C., Gubler H.U.
Biological Effects of Cyclosporin A. A New Anti-
lymphocytic Agent
Agent Actions, Vol 6: 468-475 (1976)
- (15) Borel J.F., Feurer C., Magnee C., Stähelin H.
Effect of the New Antilymphocytic Peptide Cyclosporin
A in Animals
Immunology Vol 32: 1017-1025 (1977)
- (16) Borel J.F.
Essentials of Cyclosporine A, a Novel Type of Anti-
lymphocyte Agent
Pharmacolog. Sciences 16: 146-150 (1980)
- (17) Brando B., Civati G., Grillo C., Busnach G., Colussi
G., Broggi M.L., Minetti L.
Immunological Monitoring of Viral Infections in Renal
Transplant Recipients
Proc EDTA, Vol 20: 265-270 (1983)
- (18) Brendel W., Ring J., Seifert J.
Experimental and Clinical Aspect of ALG
Prog. Immunol., Vol 5: 245 (1974)
- (19) Brendel W., Seifert, J., Ring J.
Die klinische Anwendung von Antilymphozytenglobulin
Münchener Medizinische Wochenschrift, 117: 1361-1368
(1975)

- (20) Buchanan J.M.
The Enzymatic Synthesis of the Purine Nucleotides
Harvey Lect., Vol 54: 104-130 (1958-59)
- (21) Calne R.Y., White D.J.G., Thiru S.
Cyclosporin A in Patients Receiving Renal Allografts from Cadaver Donors
Lancet Vol 2: 1323-1327 (1978)
- (22) Calne R.Y.
Immunosuppression - Adaptation of Laboratory Experience to Clinical Practice
Praxis der Nierentransplantation, hrsg. von F.W. Albert, Schattauer Verlag Stuttgart: 69-77 (1980)
- (23) Calne R.Y., White D.J.G.
The Use of Cy-A in Clinical Organ Grafting
Annual Surg. September: 330-337 (1982)
- (24) Campos H., Droz D., Debure A., Ballarin J., Chkoff N., Adaffer E., Noel L.H., Kreis H.
Eine Needle Aspiration Biopsy in der Monitoring of Rejection Episodes in Kidney Transplant Recipients
Transpl. Proc. Vol XVII, No 6 (Dec.): 2581-2582 (1985)
- (25) Carney W.P., Rubin R.H., Hoffman R.A., Hansen W.P., Healey C., Hirsch M.S.
Analysis of T-Lymphocyte Subsets in CMV Mononukleosis
J. Immunol. 126: 2114-2116 (1981)
- (26) Chang T., Kung P., Gingres S.P., Goldstein G.
Does OKT 3 Monoclonal Antibody React with an Antigen-Recognition Structure on Human T-Cells?
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1805-1808 (1981)
- (27) Charpentier B., Fries D., Lang P.H., Martin B., Raguin G., Prutchauský A.
Natural Killer Activity During Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients
Transplant. Proc. Vol XV, No 1: 384-386 (1983)
- (28) Chatenaud L., Chkoff N., Kreis H., Bach J.F.
Correlation between Immunoregulatory T-Cell Imbalances and Renal Allograft Outcome
Transplant. Proc. 15: 1184-1185 (1983)
- (29) Chatenaud L., Berrih S., Bone M.C., Kreis H., Bad J.F.
The Effects of Immunomodulation on Peripheral T-Cell Subsets
J. Clin. Immunol. Vol 12, No 3: 61-66 (1983)
- (30) Chatterjee S.N., Faulken L., Gardner M., Chatterjee S.
Murine Cytomegalovirus Infection and Cyclosporine
Transplant. Proc. Vol XVII, No 6: 2732-2733 (1985)

- (31) Cheeseman S.H., Rubin R.H., Stewart J.A.
Controlled Clinical Trial of Prophylactic Human-Leucocyte Interferon in Renal Transplantation: Effects on Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus Infections
N. Engl. J. Med. 300: 1345-1350 (1979)
- (32) Cortesini R., Stella F., Renna Molajoni E., Rossi Lemeni A., Prestagostini R., Alfani D.
Urinary Exfoliative Cytology in Kidney Allografts under Cyclosporine Therapy
Transplant. Proc. Vol XVI, No 5: 1200-1201 (1984)
- (33) Cosimi A.B., Colvin R.B., Burton R.C., Rubin R.H., Goldstein G., Kung P.C., Hansen W.P., Delmonico F.L., Russell P.S.
Use of Monoclonal Antibodies to T-Cell Subsets for Immunologic Monitoring and Treatment in Recipients of Renal Allografts
N. Engl. J. Med. Vol 305, No 6: 308-314 (1981)
- (34) Dehdorfer U., Hammer C., Schleibner S., Hillebrand G., Stoffner D., Nguyen L.H., Koller C., Gokel J.M., Land W.
Comparison of Renal Transplant Cytology with Histological Findings
Transplant. Proc. Vol XVII, No 6: 2583-2584 (1985)
- (35) De Waele M., Thielemans C., Van Camp B.K.G.
Characterization of Immunoregulatory T-Cells in EBV-Induced Infectious Mononucleosis by Monoclonal Antibodies
N. Engl. J. Med. Vol 304, No 8: 460-462 (1981)
- (36) Djeu J.Y., Stocks N., Zoon K., Stanton G.J., Timonen T., Herberman R.
Positive Self Regulation of Cytotoxicity in Human Natural Killer Cells by Production of Interferon upon Exposure to Influenza and Herpes Viruses
J. Exp. Med. Vol 156: 1222-1234 (1982)
- (37) Donatsch P., Abisch E., Homberger M., Traber R., Trapp M., Voges R.
A Radioimmunoassay to Measure Cyclosporin A in Plasma and Serum Sample
J. Immunoassay, 2(1): 19-32 (1981)
- (38) Dunn D., White D., Herbertson B., Rolles K.
Detrimental Effect of Steroids on Cy-A-Induced Prolonges Allograft Survival
Transplant. Proc. Vol XII, No 2: 335-338 (1980)
- (39) Dupont E., Huggen K., Schaudene L., Vondercruys M., Palfliet K., Wybran J.

Depressed Natural Killer Function in Transplant
Recipients: An Analysis
Transplant. Proc. Vol XVI, No 6: 1506-1507 (1984)

- (40) Ellis T.M., Berry C.R., Mendez-Picon G., Goldman M.H., Lee H.M., Mohanakumar T.
Lack of Association of Human Renal Allograft Rejection and Circulating K-Cell, NK-Cell or Total T-Cell-Levels
Clin. Immunol. Immunopathol. 25: 335-347 (1982)
- (41) Ewald R.W.
Die direkte serologische Crossmatch-Reaktion vor Nierentransplantation
Praxis der Nierentransplantation, hrsg. von F.W. Albert, Schattauer Verlag Stuttgart (1980): 41-51
- (42) Farnsworth A., Hall B.M., Bishop G.A., Duggin G.C., Goodman B., Horvath J., Ng A., Sheil A.G.R., Tiller D.J.
Pathology in Renal Transplant Patients Treated with Cyclosporin
Transplant. Proc. Vol XV, No 4: 2852-2854 (1983)
- (43) Feduska N.J., Terrier F., Vincenti F., Amend W., Biava C.G., Melzner J., Salvatierra O., Duca R., Hricak-Margulis H.
Evaluation of Acute Renal Transplant Rejection and Cyclosporine Nephrotoxicity by magnetic Resonance Imaging
Transplant. Proc. Vol XVII, No 6: 2597-2599 (1985)
- (44) Fregona I., Guttman R.D., Jean R.
HNK-1⁺ (Leu 7) and Other Lymphocyte Subsets in Long-term Survivors with Renal Allotransplants
Transplantation Vol 39, No 1: 25-29 (1985)
- (45) Gastl G., Schmalzl F., Huhn D., Gattringer C., Huber C.
Large Granular Lymphocytes: Morphological and Functional Properties. I. Results in Normals
Blut Vol 46: 297-310 (1983), Springer Verlag
- (46) Gastl G., Niederwieser D., Marth C., Huber H., Egg D., Schuler G., Margreiter R., Braunsteiner H., Huber C.
Human Large Granular Lymphocytes and Their Relationship to Natural Killer Cell Activity in Various Disease States
Blood, Vol 64, No 1: 288-295 (1984)
- (47) Gastl G., Niederwieser D., Irschik E., Kathrein H., Spielberger M., Margreiter R., Huber C.

Large Granular Lymphocytes and Their Relationship to Natural Killer Cell Activity and to Rejection Episodes in Human Renal Allograft Transplant. Proc. Vol XVII, No 6: 2527-2529 (1985)

- (48) Gehrz R.C., Rutzick S.R.
Cytomegalovirus (CMV) - Specific Lysis of CMV-Infected Target Cells Can be Mediated by Both NK-Like and Virus-Specific Cytotoxic T-Lymphocytes
Clin. Exp. Immunol. 61: 80-89 (1985)
- (49) Glazer J.P., Friedman H.M., Grossmann R.A., Stuart E., Starr M.D., Baker C.F., Perloff L.J., Huang E.S., Plotkin S.A.
Live Cytomegalovirus Vaccination of Renal Transplant Candidates
Ann. Intern. Med. 91: 676-679 (1979)
- (50) Grossi C.E., Ferrarini M.
Morphology and Cytochemistry of Human Large Granular Lymphocytes
in: "NK-Cells and Other Natural Effector Cells" Ed. Herberman R.B.: 1-8 (1982), Academic Press, Inc. New York
- (51) Guillou P.J., Hegarty J.H., Ramsden C.W., Giles G.R.
The Response of Interferon of NK and K Cells from Conventionally Immunosuppressed and Cyclosporine-Treated Renal Allograft Recipients
Transplantation Vol 38, No 2: 130-136 (1984)
- (52) Guttmann R.D., Paulsen R.S.
Fluorescence Activated Cellsorter Analysis of Lymphocyte Subsets after Renal Transplantation
Transplant. Proc. 15: 1160-1162 (1983)
- (53) Habu, S., Shimanura K., Akamatsu K., Okumura K., Tamaoki N.
Protective Role of Natural Killer Cells in Tumor Growth and Viral Infection in Mice
Exp. Cell. Biol. 52: 40-43 (1984)
- (54) Häyry P., Willebrand E.v., Soots A.
In situ Effector Mechanisms in Rat Kidney Allograft Rejection. III. Kinetics of the Inflammatory Response and Generation of Donor-Directed Killer Cells
Scand. J. Immunol. 10: 95-108 (1979)
- (55) Häyry P., Soots A., Willebrand E.v., Wiktorowicz K.
Compositions, Subclass Distribution and Preliminary Analysis of the Functions of Host Inflammatory Cells Infiltrating Renal Allografts during Rejection
Transplant. Proc. Vol XI, No 1: 785-789 (1979)

- (56) Häyry P., Willebrand E.v., Ahonen J., Lindström B.L., Eklund B.
Use of Fine Needle Aspiration Cytology of the in Situ Inflammatory Response of Kidney Allograft Rejection and the Impact of Glucocorticosteroids on the Inflammation
Transplant. Proc. Vol XII, No 2: 331-334 (1980)
- (57) Häyry P., Willebrand E.v.
Practical Guidelines for Fine Needle Aspiration Biopsy of Human Renal Allografts
Annals of Clin. Res. 13: 228-306 (1981)
- (58) Häyry P., Willebrand E.v.
Transplant Aspiration Cytology in Diagnostic Evaluation of Renal Allografts
Transplant. Proc. Vol XIII, No 3: 1575-1578 (1981)
- (59) Häyry P., Willebrand E.v.
Monitoring of Human Renal Allograft Rejection with Fine Needle Aspiration Cytology
Scand. J. Immunol. 13: 87-97 (1981)
- (60) Häyry P., Willebrand E.v., Ahonen J., Eklund B., Lautenschlager I.
Monitoring of Allograft Rejection by Transplant Aspiration Cytology
Annals of Clin. Res. 13: 264-287 (1981)
- (61) Häyry P.
Transplantat - Aspirationszytologie zur Überwachung von Nieren-Allotransplantaten
Triangel Band 21, Nr. 4: 111-121 (1982)
- (62) Häyry P., Ahonen J., Willebrand E.v.
Effect of Cy-A on the In Situ Inflammatory Response of Human Renal Allograft Rejection
Scand. J. Immunol. 16: 135-149 (1982)
- (63) Häyry P.
Inflammatory Response in Allograft Rejection
Transplant. Proc. Vol XV, No 3: 1897-1899 (1983)
- (64) Häyry P., Willebrand E.v.
Transplant Aspiration Cytology
Transplantation Vol 38, No 1: 7-12 (1984)
- (65) Hajto T., Lanzrein C.
Frequency of Large Granular Lymphocytes in Peripheral Blood of Healthy Persons and Breast Cancer Patients
Cancer Immunol. Immunother. Vol 16: 65-66 (1983)

- (66) Haller O., Kiessling R., Örn A., Wigzell H.
Generation of Natural Killer Cells: An Autonomous
Function of the Bone Marrow
J. Exp. Med. 145: 1411-1416 (1977)
- (67) Hallmann L.
Klinische Chemie und Mikroskopie
Thieme Verlag Stuttgart, 10. Auflage: 338-353 (1966)
- (68) Hamilton D.V., Evans D.B., Thiru S.
Toxicity of Cyclosporin A in Organ Grafting
in: Cyclosporin A, Chapter 35: 393-411, Ed. White
D.J.G. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam-New
York-Oxford 1982
- (69) Hammer C., Chaussy Ch., Brendel W.
Preformed natural antibodies in animals and man
Europ. Surg. Res. 5: 162 (1973)
- (70) Hammer C., Mayer P., Kreuzer E., Land W.
Feinnadelaspirationszytologie zur Diagnose von Nieren-
transplantatabstoßung
Langenbecks Arch. Chir. 335: 642 (1981)
- (71) Hammer C., Land W., Mayer P.
Fine Needle Aspiration Cytology on Human Kidney
Transplants under ALG Therapy
Europ. Surg. Res. 13: 78 (1981)
- (72) Hammer C.
Kontrolle von Nierentransplantatabstoßungen
Münchener Med. Wochenschrift 124, No 43: 929-931 (1982)
- (73) Hammer C., Land W., Koller C., Stadler J., Weber B.,
Welte M.
Analyse von Lymphozyten-Subpopulationen im zirkulie-
renden Blut und im Transplantat nach Nierentransplan-
tation
in: "Praxis der Nierentransplantation (II)", Hrsg.
Albert F.W., Seybold-Epting W., Kreiter H., Schat-
tauer Verlag Stuttgart-New York: 295-304 (1984)
- (74) Hancock W.W., Gee D., De Moerloose P., Rickles F.R.,
Ewan V.A., Atkins R.C.
Immunohistological Analysis of Serial Biopsies Taken
During Human Renal Allograft Rejection
Transplantation Vol 39, No 4: 430-438 (1985)
- (75) Heilmeyer L., Begemann H.
Atlas der klinischen Hämatologie
Springer Verlag: 1-77 (1978)

- (76) Herberman R.B., Nunn M.E., Larvin D.H.
Natural Cytotoxic Reactivity of Mouse Lymphoid Cells
Against Syngeneic and allogeneic Tumors. I. Distribution of Reactivity and Specificity
Int. J. Cancer 16: 216-229 (1975)
- (77) Herberman R.B., Nunn M.E., Holden H.T., Larvin D.H.
Natural Cytotoxic Reactivity of Mouse Lymphoid Cells
Against Syngeneic and allogeneic Tumors. II. Characterization of Effector Cells
Int. J. Cancer Vol 16: 230-239 (1975)
- (78) Herberman R.B., Holden H.T.
Natural Cell Mediated Immunity
Adv. Cancer Res. 27: 305-377 (1978)
- (79) Herberman R.B., Ortaldo J.R., Bonnard G.D.
Augmentation by Interferon of Human Natural and Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity
Nature 227: 221-223 (1979)
- (80) Herberman R.B. (Ed.)
Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors
Academic Press, Inc. New York: 1321-1326 (1980)
- (81) Herberman R.B.
Natural Killer (NK) Cells and their Possible Roles in Resistance Against Disease
Clin. Immunol. Rev. 1: 1-65 (1981)
- (82) Hillebrand G., Castro L.A., Schleibner S., Land W., Gurland H.J.
Akutes Nierenversagen (ANV) nach Nierentransplantation: Inzidenz und Prognose, 7. Donausymposium (1985)
- (83) Hillebrand G., Castro L.A., Gokel J.M., Illner W.D., Heigl F., Land W., Gurland H.J.
Niedrigdosierte Cyclosporin-Behandlung in Kombination mit Methylprednisolon und Azathioprin nach Nierentransplantation: II. Histologische Befunde
(in press)
- (84) Hirsch M.S., Schooley R.T., Cosimi A.B.
Effects of Interferon-Alpha on Cytomegalovirus Rejection Syndromes in Renal-Transplant Recipients
N. Engl. J. Med. 308: 1489-1493 (1983)
- (85) Ho M.
Virusinfections After Transplantation in Man: Brief Review
Arch. Virol. 55: 1-24 (1977)

- (86) Hoffman T., Ferrarini M.
A Role for Natural Killer Cells In Survival. Functions of Large Granular Lymphocytes, Including Regulation of Cell Proliferation
Clin. Immunol. and Immunopathol. 29: 323-332 (1983)
- (87) Hows J.M., Palmer S., Want S., Dearden C., Gordon-Smith E.C.
Serum Levels of Cyclosporin A and Nephrotoxicity in Bone-Marrow Transplant Recipients
Lancet: 145-146 (1981b)
- (88) Hows J.M., Palmer S., Gordon-Smith E.C.
Cyclosporin A in Compatible Grafting for Severe Aplastic Anaemia
in: Cyclosporin A: 511, Ed. White D.J.G.
Elsevier Biomedical, Amsterdam-New York-Oxford 1982
- (89) Huddleston J.R., Merigan T.C. Jr., Oldstone M.B.A.
Induction and Kinetics of Natural Killer Cells in Humans Following Interferon Therapy
Nature 282: 417-419 (1979)
- (90) Huhn D., Huber C., Gastl G.
Large Granular Lymphocytes: Morphological Studies
Eur. J. Immunol. Vol 12: 985-988 (1982)
- (91) Kahan B.D., Wideman C.A., Reid M., Gibbons S., Jarowenko M., Flechner S., Van Buren C.T.
The Value of Serial Serum Trough Cyclosporine Levels in Human Renal Transplantation
Transplant. Proc. Vol XVI, No 5: 1195-1199 (1984)
- (92) Kahan B.D., Van Buren C.T., Flechner S.M., Jarowenko M., Yasumura T., Rogers A.J., Yoshimura N., LeGrue S., Drath D., Kerman R.H.
Clinical and Experimental Studies with Cyclosporine in Renal Transplantation
Surg. 97: 125-140 (1985)
- (93) Kammer G.M., Smith J.A., Mitchell R.
Capping of Human T-Cell Specific Determinants: Kinetics of Capping and Receptor Re-Expression and Regulation by the Cytoskeleton
J. Immunol. Vol 130, No 1: 38-44 (1983)
- (94) Kelly A.P., Schooley R.T., Rubin R.H., Hirsch M.S.
Effect of Interferon Alpha on Natural Killer Cell Cytotoxicity in Kidney Transplant Recipients
Clin. Immunol. Immunopathol. 32: 20-28 (1984)
- (95) Kiessling R., Klein E., Wigzell H.
"Natural" Killer Cells in the Mouse. I. Cytotoxic

Cells with Specificity for Mouse Moloney Leukaemia cells. Specificity and Distribution according to Genotype
Eur. J. Immunol. 5: 112-117 (1975)

- (96) Kirwan P.D., Baxter C.R., Duggin G.G., Hall B.M., Horvath J.S., Sheil A.G.R., Tiller D.J.
Giant Mitochondria, Renal Transplant Biopsy, and Cyclosporin A
Lancet: 146-147 (1981)
- (97) Klintmalm G., Ringdén O., Groth C.
Clinical and Laboratory Signs in Nephrotoxicity and Rejection in Cyclosporine-Treated Renal Allograft Recipients
Transplant. Proc. Vol XV, No 4: 2815-2820, Suppl. 1 (1983)
- (98) Klintmalm G., Säwe J., Bahr C.v., Ringden O.
Optimal Cyclosporine Plasma Levels Decline with Time of Therapy
Transplant. Proc. Vol XVI, No 5: 1208-1211 (1984)
- (99) Köhler G., Milstein C.
Continuous cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity
Nature Vol 256: 495-497 (1975)
- (100) Koller C., Stadler J., Hammer C., Schneider B., Land W., Brendel W.
Evaluation of FNAB and TAC by Coulter Counting, in: 2nd Int. Workshop, Renal Transplant Cytology, Paris 1983
Hrsg. Kreis H., Droz D., Wichtig Editore, Mailand, Italien: 39-44 (1983)
- (101) Koller C., Hammer C., Gokel J.M., Land W., Hillebrand D., Castro L.A., Stadler J., Weber B.
Correlation between Core Biopsy and Aspiration Cytology
Transplant. Proc. Vol XVI: 1298-1300 (1984)
- (102) Koller C.
Überwachung der immunologischen Ereignisse in allo-genen Nierentransplantaten mit Hilfe der Feinnadel-aspirationszytologie in Verbindung mit einem elektro-nischen Coulter-Counter.
Untersuchung der technischen Durchführung und Zuver-lässigkeit sowie kritische Betrachtung von Aussage-kraft, Wert und Indikation der Methode in Zusammen-hang mit klinischen Parametern und der Stanzbiopsie
Dissertation an der LMU München 1986

- (103) Krause P.H.
Morphologie der Abstoßungsreaktion
in: "Transplantationschirurgie", Hrsg. R. Pichlmayr,
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York: 268-300
(1981)
- (104) Kreis H.A.
Use of Fine Needle Aspiration Cytology to Diagnose
Rejection
Transplant. Proc. Vol XVI: 1569-1572 (1984)
- (105) Kung P.C., Goldstein G., Reinherz E.L., Schlossman
S.F.
Monoclonal Antibodies Defining Distinctive Human
T-Cell Surface Antigens
Science, Vol. 209: 347-349 (1979)
- (106) Kurtz J.B., Thompson J.F., Ting A., Pinto A., Morris
P.J.
The Problem of Cytomegalovirus Infection in Renal
Allograft Recipients
Quarterly J. Med., New Series LIII, No 211: 341-349
(1984)
- (107) Land W.
Klinik der Organtransplantation - Transplantations-
zentrum München 1976 - 1982, hrsg. von W. Land: 86-116
- (108) Land W., Castro L.A., Illner W.D.
Nierentransplantation bei Risikopatienten
Bayer. Internist 4: 15 (1982)
- (109) Lerner M.
Infections with Herpes Simplex Virus
Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw
Hill intern. book company 1983: 1162-1167
- (110) Lersch C., Hammer C., Plahl M., Lehmann M., Reichen-
spurner H., Reichart B.
Differentialdiagnose zwischen Abstoßungsreaktion und
Infektion aus dem peripheren Blut von herztransplan-
tierten Patienten
Chirurg. Forum '85 f. experim. und klin. Forschung,
Hrsg. Stelzner F.: 179-181 (1985)
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg
- (111) Lindquist R.R., Guttman R.D., Merrill J.P.
Renal Transplantation in the Inbred. Rat VI. Electron
Microscopic Study on the Mononuclear Cells Accumu-
lated in Rejecting Renal Allografts
Transplantation 12: 1-10 (1971)

- (112) Lipinski M., Tursz T., Kreis H., Finale Y., Amiel J.L.
Dissociation of Natural Killer Cell Activity and
Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity in Kid-
ney Allograft Recipients Receiving High-Dose Immuno-
suppressive Therapy
Transplanation, Vol 29, No 3: 214-218 (1980)
- (113) Lopez C., Simmons R.L., Maver S.M., Najarian J.S.,
Good R.A.
Association of Renal Allograft Rejection With Virus
Infections
Am. J. Med. 56: 280-289 (1974)
- (114) Maboe C.C., Knowles D.M., Chess L., Reemtsma K.,
Fenoglio J.J.
The Immunologic and Ultrastructural Characterization
of the Cellular Infiltrate in Acute Cardiac Allograft
Rejection: Prevalence of Cells with the Natural Kil-
ler (NK) Phenotyp
Clin. Immunol. Immunopathol. 27: 141-147 (1983)
- (115) Marker S.C., Ascher N.L., Kalis J.M., Simmons R.L.,
Najarian J.S., Balfour H.H.
Epstein-Barr Virus Antibody Responses and Clinical
Illness in Renal Transplant Recipients
Surgery, 85: 433-440 (1979)
- (116) Mihatsch M.J., Olivieri W., Marbet I., Thiel G.,
Harder F., Zollinger H.U.
Giant Mitochondria in Renal Tubular Cells and Cyclo-
sporin A
Lancet: 1162-1163 (1981)
- (117) Mihatsch M.J., Thiel G., Spichtin H.P., Oberholzer M.,
Brunner F.P., Harder F., Olivieri V., Bremer R.,
Ryffell B., Stöcklin E., Torhorst F., Gudat F., Zol-
linger H.U., Loertscher R.
Morphological Findings in Kidney Transplants After
Treatment with Cyclosporine
Transplant. Proc. XV, No 4: 2821-2835, Suppl. 1 (1983)
- (118) Myers B.D.
Cyclosporine-associated Chronic Nephropathy
N. Engl. J. Med. 311, No 11: 699-705 (1984)
- (119) Najarian J.S., Fryd, D.S., Strand M., Canafax D.M.,
Asher N.L., Payne W., Simmons R.L., Sutherland D.E.R.
A Single Institution, Randomized, Prospective Trial
of Cyclosporine versus Azathioprine - Antilymphocyte
Globuline for Immunosuppression in Renal Allograft
Recipients
Ann. Surg. 201: 142-157 (1985)

- (120) Naraqi S., Jonasson O., Jackson G.G., Yamashiroya H.M.
Clinical Manifestations of Infections with Herpesvirus
after Kidney Transplantation. A Prospective Study of
Various Syndroms
Ann. Surg. 188: 234-239 (1978)
- (121) Natusch R., Kettler L.H.
Nierenbiopsie - in: Nierendiagnostik, Hrsg. Dutz H.,
VEB Gustav Fischer Verlag: 268-327 (1972)
- (122) Nemlander A., Saksela E., Häyry P.
Are "Natural Killer" Cells Involved in Allograft
Rejection?
Eur. J. Immunol. 13: 348-350 (1983)
- (123) Opelz G.
The Influence of Ischemia Times and HLA-DR-Matching
on Cyclosporine-Treated Cadaver Kidney Grafts
Transplant. Proc. Vol XVII, No 1: 1478-1482 (1985)
- (124) Ortaldo J.R., Sharrow S.O., Timonen T., Herberman R.B.
Determination of Surface Antigens on Highly Purified
Human NK Cells by Flow Cytometry with Monoclonal
Antibodies
J. Immunol. Vol 127: 2401-2409 (1981)
- (125) Ortaldo J.R.
Natural Killer Cells: A Separate Lineage?
in: "NK-Cells and Other Natural Effector Cells", Ed.
Herberman R.B.: 265-271 (1982), Academic Press, Inc.
New York
- (126) Pappenheim A., Ferrata A.
Über die verschiedenen lymphoiden Zellformen des nor-
malen und pathologischen Blutes
Folia Haemat. 10: 78 (1911)
- (127) Pass R.F., Long W.K., Whithy R.J., Soong S.J., Diet-
helm A.G., Reynolds D.W.
Productive Infection with CMV and HSV in Renal Trans-
plant Recipients: Role of Source of Kidney
J. Infect. Dis. 137: 556-563 (1978)
- (128) Pass R.F., Griffiths P.D., August A.M.
Antibody Response to Cytomegalovirus after Renal
Transplantation: Comparison of Patients with Primary
and Recurrent Infections
J. Infect. Dis. Vol 147, No 1: 40-46 (1983)
- (129) Pasternack A.
Fine-needle Aspiration Biopsy of Human Renal Homo
Grafts
Lancet Vol 2: 82-87 (1968)

- (130) Pasternack A., Virolainen M., Häyry P.
Fine Needle Aspiration in the Diagnosis of Human Renal
Allograft Rejection
The J. of Urology, Vol 109: 167-172 (1973)
- (131) Peterson P.K., Rynaiewicz J.J., Simmons R.L., Ferguson R.M.
Decreased Incidence of Overt CMV Disease in Renal
Allograft Recipients Receiving CsA
Transplant. Proc. Vol XV: 457-459 (1983)
- (132) Pichlmayr R., Wonigeit K., Ringe B., Block T., Raab R., Heigel B., Neuhaus P.
Rejection and Nephrotoxicity. Diagnostic Problems with
Cyclosporin in Renal Transplantation
Proc. EDTA-ERA, Vol 21: 947-960 (1984)
- (133) Quinnan G.V., Manischewitz J.E., Ennis F.A.
Cytotoxic T Lymphocyte Response to Murine Cytomegalovirus Infection
Nature 273: 541-545 (1978)
- (134) Quinnan G.V., Manischewitz J.E.
The Role of Natural Killer Cells and Antibody-Dependent Cell Mediated Cytotoxicity During Murine Cytomegalovirus Infection
J. Exp. Med. 150: 1549-1554 (1979)
- (135) Ramsey K.M., Djeu J.Y., Rook A.H.
Decreases Circulating Large Granular Lymphocytes Associated with Depressed Natural Killer Cell Activity in Renal Transplant Recipients
Transplantation Vol 38, No 4: 351-356 (1984)
- (136) Reichenspurner H., Hammer C., Lersch C., Brendel W., Reichart B., Kemkes B.M., Gokel J.M.
Cytological and Immunological Monitoring of Heart Transplant Patients Treated with Cyclosporin A
Chirurg. Forum '84 f. experim. und klin. Forschung Hrsg. Koslowski L.: 85-87 (1984), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg
- (137) Reinherz E.L., Kung P.C., Goldstein G., Schlossman S.F.
Separation of Functional Subsets of Human T-Cells by a Monoclonal Antibody
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol 76, No 8: 4061-4065 (1979)
- (138) Reinherz E.L., Kung P.C., Goldstein G., Schlossman S.F.
A Monoclonal Antibody with Selective Reactivity with

Functionally Mature Human Thymocytes and All Peripheral Human T-Cells

J. Immunol. Vol 123, No 3: 1312-1317 (1979)

- (139) Reinherz E.L., Kung P.C., Goldstein G., Schlossman S.F.
Further Characterization of the Human Inducer T-Cell Subset Defined by Monoclonal Antibody
J. Immunol. Vol 123, No 6: 2894-2896 (1979)
- (140) Reinherz E.L., Kung P.C., Goldstein G., Schlossman S.F.
A Monoclonal Antibody Reactive with the Human Cytotoxic/Suppressor T-Cell Subset Previously Defined by a Heteroantiserum Termed TH₂
J. Immunol. Vol 124, No 3: 1301-1307 (1980)
- (141) Reinherz E.L., Morimoto C., Penta A.C., Schlossman S.F.
Regulation of B-Cell Immunoglobulin Secretion by Functional Subsets of T-Lymphocytes in Man
Eur. J. Immunol. 10: 570-572 (1980)
- (142) Reinherz E.L., O'Brian C., Rosenthal B., Schlossman S.F.
The Cellular Basis for Viral Induced Immunodeficiency Analysis by Monoclonal Antibodies
J. Immunol. 123: 1269-1272 (1980)
- (143) Renna Molajoni E., Barnaba V., Bachetoni A., Levrero M., Cinti P., Rossi M., Alfani D., Cortesini R.
Monitoring of NK-1 and NK-15 Subsets and Natural Killer Activity in Kidney Transplant Recipients Receiving Cyclosporine
Proc EDTA-ERA Vol 21: 1042-1046 (1984)
- (144) Reynolds C.W., Rees R., Timonen T., Herberman R.B.
Identification and Characterization of the Natural Killer (NK) Cells in Rats
in: "NK Cells and Other Natural Effector Cells", Ed. Herberman R.B.: 17-23 (1982), Academic Press, Inc. New York
- (145) Rigby R.J., Smillie A., Cheung K., Robinson M.F.
Natural Killer Activity in Renal Allograft Recipients and Response to Interferon
Transplant. Proc. Vol XVII, No 2: 1682-1684 (1985)
- (146) Roder J.C., Pross H.F.
The Biology of the Human Natural Killer Cell
J. Clin. Immunol. 2: 249-263 (1982)

- (147) Rössler E.
Wertigkeit der Feinnadelaspirationszytologie zur Diagnose pathologischer Vorgänge nach allogener Nierentransplantation
Dissertation an der LMU München 1983
- (148) Rook A.H., Smith W.J., Burdick J.K., Manischewitz J.K., Frederick W., Siegel J.P., Williams G.M., Quinnan G.V.
Virus-Specific Cytotoxic Lymphocyte Responses Are Predictive of the Outcome of Cytomegalovirus Infection of Renal Transplant Recipients
Transplant. Proc., Vol XVI, No 6: 1466-1469 (1984)
- (149) Rubin R.H.
Infection in the Renal Transplant Patient
in: Clinical Approach to Infection in the Compromised Host, Eds. Rubin R.H., Young L.S.: 553-606 (1981), Plenum Medical Books, New York
- (150) Ryffel B.
Experimental Toxicological Studies with Cyclosporin A
in: Cyclosporin A - Chapter 5: 45-75, Ed. White D.J.G. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam-New York-Oxford 1982
- (151) Saksela E., Timonen T., Ranki A., Häyry P.
Morphological and Functional Characterization of Isolated Effector Cells Responsible for Human Natural Killer Activity of Fetal Fibroblasts and to Cultured Cell Line Targets
Immunol. Rev. 44: 71-123 (1979)
- (152) Salaman J.R.
Pharmacologic Immunosuppression
Transplant. Proc. XVIII, No 1: 311-314 (1981)
- (153) Schooley R.T., Hirsch M.S., Colvin R.B., Cosimi A.B., Tolkoﬀ-Rubin N.E., McCluskey R.T., Burton R.C., Russell P.S., Herrin J.T., Delmonico F.L., Giorgi J.V., Henle W., Rubin R.H.
Association of Herpesvirus Infections with T-Lymphocyte-Subset Alterations, Glomerulopathy, and Opportunistic Infections after Renal Transplantation
New Engl. J. Med. Vol 308, No 6: 307-313 (1983)
- (154) Sibley R.K., Ferguson R.M., Sutherland D.E.R., Simmons R.L., Najarian J.S.
Morphology of Cyclosporine Nephrotoxicity and of Acute Rejection in Cyclosporine-Prednisone Immunosuppressed Renal Allograft Recipients
Transplant. Proc. Vol XV, No 4: 2836-2841 (1983)

- (155) Siebert W., Illner W.D., Zöttlein H., Castro L.A., Land W.
Cyclosporine A in Kidney-transplanted Patients without Initial Diuresis
Transplant. Proc. Vol XVI, No 1: 285-287 (1984)
- (156) Simonton S.C., Rynosiewicz J., Sibley R.K.
Light Microscopic and Electron Microscopic Features of Experimental Cyclosporin A Nephrotoxicity
Lab. Invest. 48: 78 A (1983)
- (157) Smith W.J., Burdick J.F., Williams G.M.
Fluorescent and Light Microscopic Analysis of Peripheral Blood Leucocytes From Human Renal Allograft Recipients
Transplant. Proc. Vol XVI, No 6: 1546-1547 (1984)
- (158) Snyderman D.R., McIver J., Leszczynski J., Cho S.I., Werner B.G., Berardi V.P., LoGerfo F., Heinze-Lacey B., Grady G.F.
A Pilot Trial of a Novel Cytomegalovirus Immune Globulin in Renal Transplant Recipients
Transplantation, Vol 38, No 5: 553-557 (1984)
- (159) Stadler J., Koller C., Hammer C., Weber B., Land W., Castro L.A., Brendel W.
Monitoring of Viral Infections After Renal Transplantation by Fine Needle Aspiration Biopsy and Monoclonal Antibodies
Transplant. Proc. Vol XVII, No 1: 168-170 (1985)
- (160) Stadler J.
Immunologisches Monitoring nach Nierentransplantation. Differenzierung von mononukleären Zellen mit monoklonalen Antikörpern im Peripheren Blut und im Transplantat
Dissertation an der LMU München 1986
- (161) Starzl T., Weil R., Shunzaburo J.
The Use of CSA and Prednisone in Cadaver Kidney Transplantation
Surgery, Gynecology, Obstetrics, Vol 151: 17-26 (1980)
- (162) Stoffner D., Castro L.A., Hillebrand G., Gokel J.M., Schleibner S., Land W., Gurland H.J.
Über die chronische Nephrotoxizität von Cyclosporin nach Nierentransplantation (Langzeituntersuchung im Vergleich mit Azathioprin-behandelten Patienten)
Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Jahrgang 15, Nr. 4: 145-148 (1986)
- (163) Strom T.B., Tilney N.L., Carpenter C.B.
Identity and Cytotoxic Capacity of Cells Infiltrating

Renal Allograft

N. Engl. J. Med. 292, 24: 1257-1263 (1975)

- (164) Susaki T., Masakuni F., Tekasaki S., Ishikawa E.
Giant Mitochondria in the Epithelial Cells of the
Proximal Convolute Tubules of diseased Human Kidneys
Lab. Invest. 33: 578-590 (1975)
- (165) Targan S., Dorey F.
Interferon-Activation of "Prespontaneous Killer"
(Pre SK) Cells and Alteration in Kinetics of Lysis
of Both "Pre SK" and Active SK cells
J. Immunol. 124: 2157-2160 (1980)
- (166) Tötterman T.H., Lindgren P.G., Frödin L., Sjöberg O.,
Wahlberg J., Tuveson G.
Cyclosporine Determinations in Kidney Needle Biopsies:
Method and Clinical Results
Transplant. Proc. Vol XVII, No 6: 2730-2731 (1985)
- (167) Thiru S., Calne R.Y., Nagington J.
Lymphomas in Renal Allograft Patients Treated with
Cyclosporin A as One of the Immunosuppressive Agents
Transplant. Proc. Vol XIII: 359-364 (1981)
- (168) Thiru S., Calne R.Y.
Giant Mitochondria, Renal Transplant Biopsy, and
Cyclosporin A
Lancet: 147-155 (1981)
- (169) Thiru S., Maher E.R., Hamilton D.V., Evans D.B.,
Calne R.Y.
Tubular Changes in Renal Transplant Recipients on
Cyclosporin A
Transplant Proc. Vol XV, No 4: 2846-2851 (1983)
- (170) Thomas G., Sosman J., Irigoyen O., Friedman S.M.,
Kung P.C., Goldstein G., Chess L.
Functional Analysis of Human T-Cell Subsets Defined
by Monoclonal Antibodies
J. Immunol. Vol 125, No 6: 2402-2407 (1980)
- (171) Timonen T., Saksela E., Ranki A., Häyry P.
Fractionation, Morphological and Functional Character-
ization of Effector Cells Responsible for Human
Natural Killer Activity Against Cell-Line Targets
Cell. Immunol. Vol 48: 133-148 (1979)
- (172) Timonen T., Saksela E.
Isolation of Human Natural Killer Cells by Density
Gradient Centrifugation
J. Immunol. Methods Vol 36: 285-289 (1980)

- (173) Timonen T., Ortaldo J.R., Herberman R.B.
Characteristics of Human Large Granular Lymphocytes
and Relationship to Natural Killer and K Cells
J. Exp. Med. Vol 153: 569-582 (1981)
- (174) Timonen T., Ortaldo J.R., Herberman R.B.
Analysis by a Single Cell Cytotoxicity Assay of Natural
Killer (NK) Cell Frequencies Among Human Large
Granular Lymphocytes and of the Effects of Interferon
on Their Activity
J. Immunol. Vol 128, No 6: 2514-2521 (1982)
- (175) Timonen T., Ortaldo J.R., Herberman R.B.
Analysis of Natural Killer Activity of Human Large
Granular Lymphocytes at a Single Cell Level
in: "NK Cells and Other Natural Effector Cells", Ed.
Herberman R.B.: 9-16 (1982), Academic Press, Inc.
New York
- (176) Timonen T., Ortaldo J.R., Herberman R.B.
Cultures of Purified Human Natural Killer Cells
in: "NK Cells and Other Natural Effector Cells", Ed.
Herberman R.B.: 821-827 (1982), Academic Press, Inc.
New York
- (177) Ting A., Morris P.J.
HLA and Organ Transplantation, Tissue Transplantation
Clinical Surg. Int., Vol 3: 28-37 (1982)
- (178) Undritz E.
Sandoz - Atlas of Haematology
Sandoz LTD Basel (1978)
- (179) Van Wauwe J., De Mey J.R., Goossens J.G.
OKT 3: A Monoclonal Anti-Human T-Lymphocyte Antibody
with Potent Mitogenic Properties
J. Immunol. Vol 124: 2708-2713 (1980)
- (180) Van Wauwe J., Goossens J.
Monoclonal Anti-Human T-Lymphocyte Antibodies: Enumeration
and Characterisation of T-Cell Subsets
Immunol. 42: 157-164 (1981)
- (181) Waltzer W.C., Bachvaroff R.J., Anaise D., Rapaport
F.T.
Natural Killer Activity After Renal Transplantation
Transplant. Proc. Vol XVI, No 6: 1527-1529 (1984)
- (182) Waltzer W.C., Bachvaroff R.J., Arnold A., Anaise D.,
Rapaport F.T.
Immunological Consequence of Renal Transplantation
and Immunosuppression. I. Alterations in Human Natu-

ral Killer Cell Activity

J. Clin. Immunol. Vol 5, No 2: 78-83 (1985)

- (183) Waltzer W.C., Arnold A.N., Anaide D., Lehr H.A., Rapaport F.T.
A Comparison of the Effects of Cyclosporine and Azathioprine on Human Natural Killer Activity in Renal Allograft Recipients
Transplant. Proc. Vol XVII, No 6: 2719-2722 (1985)
- (184) Whiting P.H., Thomson A.W., Blair J.T.
Experimental Cyclosporin A Nephrotoxicity
Br. J. Exp. Pathol. 63: 88-94 (1982)
- (185) Willebrand E.v., Soots A., Häyry P.
In Situ Effector Mechanisms in Rat Kidney Allograft Rejection. I. Characterization of the Host Cellular Infiltrate in Rejecting Allograft Parenchyma
Cell. Immunol. 46: 309-326 (1979)
- (186) Willebrand E.v.
Fine-Needle Aspiration Cytology of Human Renal Transplants
Clinical Immunol. and Immunopathol. 17: 309-322 (1980)
- (187) Willebrand E.v., Häyry P.
Cyclosporin A Deposits in Renal Allografts
Lancet, July 23: 189-192 (1983)
- (188) Willebrand E.v., Häyry P.
Demonstration of Cyclosporin in Renal Transplants by Fine Needle Aspiration Biopsy
Transpl. Proc. Vol XV, No 4: 2716-2718 (1983)
- (189) Willebrand E.v., Häyry P.
Reproducibility of the Fine-Needle Aspiration Biopsy - Analysis of 93 Double Biopsies
Transplantation, Vol 38, No 3: 314-316 (1984)
- (190) Wonigeit K.
Transplantationsimmunologie
in: "Transplantationschirurgie", Hrsg. R. Pichlmayr, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York: 29-109 (1981)
- (191) Zarling J.M., Kung P.C.
Monoclonal Antibodies Which Distinguish Between Human NK and Cytotoxic T Lymphocytes
Nature 288: 394-396 (1980)

- (192) Zarling J.M., Clouse K.A., Biddison W.E., Kung P.C.
Phenotypes of Human Natural Killer Cell Populations
Detected with Monoclonal Antibodies
J. Immunol. Vol 127, No 6: 2527-2580 (1981)
- (193) Zollinger H.U., Mihatsch M.J.
Renal Pathology in Biopsy: Light, Electron and Immuno-
fluorescent Microscopy and Clinical Aspects
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1978)

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel möchte ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut für chirurgische Forschung und für seine bereitwillige Unterstützung danken. Seine Begeisterungs-, aber auch Kritikfähigkeit war mir stets ein großes Vorbild.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. vet. C. Hammer für die wissenschaftliche Betreuung, freundschaftliche Motivation und Unterstützung im Verlauf der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Land danke ich für die Zustimmung zur Durchführung der Feinnadelbiopsie an Patienten des Transplantationszentrums München und für die Erlaubnis zur Einsichtnahme der klinischen Daten und für die Hilfestellung seiner Mitarbeiter.

An Herrn Dr. Castro und Herrn Dr. Hillebrand ergeht mein Dank stellvertretend für die Kollegen der Nephrologischen Abteilung der I. Medizinischen Klinik für die Durchführung der Feinnadelbiopsien, kritische Diskussionsbereitschaft und für den Einblick in die klinische Problematik.

Für die Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung schulde ich den Medizinisch-Technischen Assistentinnen des Instituts, insbesondere Fr. Höbel und Fr. Csapo, besonderen Dank.

LEBENS LAUF

Geboren am: 4. Januar 1959 in München

Wohnhaft: Georg-Thiele-Straße 4,
8000 München 82

Vater: Andreas Weber
geb. 02.06.1927 in Mintraching/
Freising, Beamter

Mutter: Isolde Weber, geb. Schiller
geb. 05.07.1928 in München

Schwester: Dr. Henriette Weber
geb. 12.11.1957 in München
Ärztin

1965 - 1969 Volksschule an der Leibengerstraße
in München

1969 - 1978 Edith-Stein-Gymnasium der Domini-
kanerinnen in München
Abitur am 29.06.1978

1979 - 1985 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität in
München
Approbation am 25.11.1985

seit Okt. 1986 Assistenzärztin im Krankenhaus
Martha-Maria in München-Solln

